

Tehnologija proizvodnje funkcionalnog napitka na bazi sladovine

Marić, Nikola

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:941482>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE FUNKCIONALNOG NAPITKA NA
BAZI SLADOVINE**

DIPLOMSKI RAD

NIKOLA MARIĆ

Matični broj: 43

Split, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ
PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE FUNKCIONALNOG NAPITKA
NA BAZI SLADOVINE

DIPLOMSKI RAD

NIKOLA MARIĆ
Matični broj: 43

Split, rujan 2023.

**UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY
FOOD TECHNOLOGY**

**PRODUCTION TECHNOLOGY OF WORT-BASED FUNCTIONAL
BEVERAGE**

DIPLOMA THESIS

**Nikola Marić
Parent number: 43**

Split, September 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet
Diplomski studij Prehrambena tehnologija

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Mentor: Izv. prof. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić
Komentor: Dr. sc. Sanja Radman

TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE FUNKCIONALNOG NAPITKA NA BAZI SLADOVINE

Nikola Marić, 43

Sažetak:

Funkcionalni napitci su jedna od kategorija unutar koncepta funkcionalne hrane. Najpopularnija su i najraširenija kategorija funkcionalne hrane zahvaljujući svojoj praktičnosti, mogućnosti da zadovolje zahtjeve potrošača za poželjnim hranjivim tvarima i funkcionalnim sastojcima, jednostavnosti distribucije te mogućnosti mijenjanja veličine, oblika i izgleda ambalaže. Razvoj funkcionalnog napitka je složen proces, a funkcionalnost konačnog proizvoda ovisi o odabiru početnih sirovina i sastojaka, načinu (metodi) obrade, skladištenja, isporuke i postizanja odgovarajućih senzorskih svojstava. U ovom diplomskom radu proizveden je funkcionalni napitak na bazi sladovine dobivene od ječmenog slada koristeći Grainfather sustav. Tehnologija proizvodnje napitka može se podijeliti u dvije faze, a to su dobivanje sladovine (ukomljavanje) te fermentacija sladovine pomoću bakterija mliječne kiseline. Funkcionalnost proizvoda dijelom proizlazi iz same sirovine (ječma) koji sadrži fitokemikalije, a dijelom se postiže i tehnološkim (sladovanje) te biološkim postupkom (fermentacija). U proizvodnji su korištene bakterije mliječne kiseline koje svojim djelovanjem poboljšavaju organoleptička svojstva i produžuju rok trajanja napitka te imaju probiotičko djelovanje. Proizvedeni napitak karakterizira kiselkast okus zbog niske pH vrijednosti (3,65) koja je rezultat nastanka mliječne kiseline tijekom procesa fermentacije. Iako je GC-MS analizom utvrđeno da hlapljive spojeva arome u najvećem udjelu čine alkoholi poput etanola i 3-metilbutan-1-ola do izražaja najviše dolazi citrusni miris (po limunu) koji se pripisuje limonenu, spoju iz skupine terpena. Funkcionalnost napitka postignuta je izborom ječmenog slada kao sirovine te procesom fermentacije pomoću bakterija mliječne kiseline koje na taj način indirektno utječu na funkcionalnost proizvoda stvaranjem različitih poželjnih kao i smanjenjem nepoželjnih spojeva. Mikrobiološkom analizom je potvrđeno da bakterije mliječne kiseline u ovom napitku i direktno utječu na funkcionalnost kao probiotici zbog visokog broja bakterija ($2,2 \times 10^6$ CFU/mL).

Ključne riječi: funkcionalni napitak, sladovina, Grainfather sustav, fermentacija, bakterije mliječne kiseline

Rad sadrži: 59 stranica, 23 slike, 5 tablica, 65 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. Izv. prof. dr. sc. Danijela Skroza – predsjednik Povjerenstva
2. Dr. sc. Sanja Radman – komentor
3. Izv. prof. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić – mentor

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology
Graduate study of Food Technology

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Supervisor: Ph.D. Ivana Generalić Mekinić, Assoc. Prof.
Co-supervisor: Ph.D. Sanja Radman

PRODUCTION TECHNOLOGY OF WORT-BASED FUNCTIONAL BEVERAGE

Nikola Marić, 43

Abstract:

Functional beverages are one of the categories within the concept of functional foods. They are the most popular and widely used category of functional foods because of their practicality, ability to meet consumer demand for desirable nutrients and functional components, ease of distribution and the ability to change size, shape and appearance of the packaging. The development of a functional beverage is a complex process, and the functionality of the final product depends on the selection of starting raw materials and ingredients, processing, storage, and delivery methods and the achievement of appropriate sensory characteristics. In this diploma thesis, a functional beverage based on barley malt wort was produced using the Grainfather system. The production technology of the beverage can be divided into two phases, namely the production of the wort (brewing) and the fermentation of the wort by lactic acid bacteria. The functionality of the product results on the one hand from the raw material itself (barley) due to its phytochemicals and on the other hand from the technological (malting) and biological (fermentation) processes. The lactic acid bacteria, used in the production process improve the organoleptic properties, extend the shelf life of the beverage and have a probiotic effect. The beverage produced is characterized by a sour taste due to the low pH value (3,65), resulting from the formation of lactic acid during the fermentation process. Although the GC-MS analysis showed that the volatile aroma substances are predominantly alcohols, such as ethanol and 3-methylbutan-1-ol, the citrus aroma (lemon-like), which is attributed to the compound from the terpene group limonene is most prominent. The functionality of the beverage is achieved through the selection of barley malt as raw material and the fermentation process using lactic acid bacteria, which indirectly affect the functionality of the product by forming various desirable compounds and reducing undesirable ones. The microbiological analysis confirmed that the lactic acid bacteria in this beverage also have direct impact on the functionality as probiotics due to the high number of bacteria ($2,2 \times 10^6$ CFU/mL).

Keywords: functional beverage, wort, Grainfather system, fermentation, lactic acid bacteria

Thesis contains: 59 pages, 23 figures, 5 tables, 65 references

Original in: Croatian

Defence committee for evaluation and defense of diploma thesis:

1. Ph.D. Danijela Skroza, Assoc. Prof. – chair person
2. Ph.D. Sanja Radman – co-supervisor
3. Ph.D. Ivana Generalić Mekinić, Assoc. Prof. – supervisor

Defence date:

Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

*Diplomski rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju
Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane
Generalić Mekinić i komentorstvom dr. sc. Sanje Radman, u razdoblju od listopada 2022.
do rujna 2023. godine.*

ZAHVALA

Hvala mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić na pomoći, danim savjetima i strpljenju tijekom izrade i pisanja ovog diplomskog rada. Hvala komentorici dr. sc. Sanji Radman na pomoći i provedbi GC-MS analize, te izv. prof. dr. sc. Danijeli Skrozi i mag. ing. agr. Roberti Frleti Matas na mikrobiološkoj analizi. Također, hvala i mojoj obitelji na razumijevanju i podršci tijekom svih ovih godina studiranja.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- objasniti koncept funkcionalne hrane,
- opisati tehnologiju proizvodnje funkcionalnog napitka,
- proizvesti funkcionalni napitak fermentacijom sladovine dobivene od ječmenog slada pomoću bakterija mliječne kiseline,
- odrediti sadržaj šećera, pH vrijednost, hlapljive spojeve arome te broj bakterija pripremljenog napitka.

SAŽETAK

Funkcionalni napitci su jedna od kategorija unutar koncepta funkcionalne hrane. Najpopularnija su i najraširenija kategorija funkcionalne hrane zahvaljujući svojoj praktičnosti, mogućnosti da zadovolje zahtjeve potrošača za poželjnim hranjivim tvarima i funkcionalnim sastojcima, jednostavnosti distribucije te mogućnosti mijenjanja veličine, oblika i izgleda ambalaže. Razvoj funkcionalnog napitka je složen proces, a funkcionalnost konačnog proizvoda ovisi o odabiru početnih sirovina i sastojaka, načinu (metodi) obrade, skladištenja, isporuke i postizanja odgovarajućih senzorskih svojstava. U ovom diplomskom radu proizveden je funkcionalni napitak na bazi sladovine dobivene od ječmenog slada koristeći Grainfather sustav. Tehnologija proizvodnje napitka može se podijeliti u dvije faze, a to su dobivanje sladovine (ukomljavanje) te fermentacija sladovine pomoću bakterija mliječne kiseline. Funkcionalnost proizvoda dijelom proizlazi iz same sirovine (ječma) koji sadrži fitokemikalije, a dijelom se postiže i tehnološkim (sladovanje) te biološkim postupkom (fermentacija). U proizvodnji su korištene bakterije mliječne kiseline koje svojim djelovanjem poboljšavaju organoleptička svojstva i produžuju rok trajanja napitka te imaju probiotičko djelovanje. Proizvedeni napitak karakterizira kiselkast okus zbog niske pH vrijednosti (3,65) koja je rezultat nastanka mliječne kiseline tijekom procesa fermentacije. Iako je GC-MS analizom utvrđeno da hlapljive spojeva arome u najvećem udjelu čine alkoholi poput etanola i 3-metilbutan-1-ola do izražaja najviše dolazi citrusni miris (po limunu) koji se pripisuje limonenu, spoju iz skupine terpena. Funkcionalnost napitka postignuta je izborom ječmenog slada kao sirovine te procesom fermentacije pomoću bakterija mliječne kiseline koje na taj način indirektno utječu na funkcionalnost proizvoda stvaranjem različitih poželjnih kao i smanjenjem nepoželjnih spojeva. Mikrobiološkom analizom je potvrđeno da bakterije mliječne kiseline u ovom napitku i direktno utječu na funkcionalnost kao probiotici zbog visokog broja bakterija ($2,2 \times 10^6$ CFU/mL).

Ključne riječi: funkcionalni napitak, sladovina, Grainfather sustav, fermentacija, bakterije mliječne kiseline

ABSTRACT

Functional beverages are one of the categories within the concept of functional foods. They are the most popular and widely used category of functional foods due to their practicality, ability to meet consumer demand for desirable nutrients, and functional components, ease of distribution and the ability to change size, shape and appearance of the packaging. The development of a functional beverage is a complex process, and functionality of the final product depends on the selection of starting raw materials and ingredients, processing, storage, and delivery methods and the achievement of appropriate sensory characteristics. In this diploma thesis, a functional beverage based on barley malt wort was produced using the Grainfather system. The production technology of the beverage can be divided into two phases, namely the production of the wort (brewing) and the fermentation of the wort by lactic acid bacteria. The functionality of the product results on the one hand from the raw material itself (barley) due to its phytochemicals and on the other hand from the technological (malting) and biological (fermentation) processes. The lactic acid bacteria, used in the production process improve the organoleptic properties, extend the shelf life of the beverage and have a probiotic effect. The beverage produced is characterized by a sour taste due to the low pH value (3,65), resulting from the formation of lactic acid during the fermentation process. Although the GC-MS analysis showed that the majority of the volatile aroma substances are predominantly alcohols, such as ethanol and 3-methylbutan-1-ol, the citrus aroma (lemon-like), which is attributed to the compound from the terpene group limonene is most prominent. The functionality of the beverage is achieved through the selection of barley malt as raw material and the fermentation process using lactic acid bacteria, which indirectly affect the functionality of the product by forming various desirable compounds and reducing undesirable ones. The microbiological analysis confirmed that the lactic acid bacteria in this beverage also have a direct impact on the functionality as probiotics due to the high number of bacteria ($2,2 \times 10^6$ CFU/mL).

Keywords: functional beverage, wort, Grainfather system, fermentation, lactic acid bacteria

SADRŽAJ

UVOD.....	1
1 OPĆI DIO	2
1.1 Definiranje koncepta funkcionalne hrane	2
1.2 Znanstvene osnove funkcionalne hrane	4
1.2.1 Tvrdnje o funkcionalnosti hrane	5
1.2.2 Markeri.....	6
1.2.3 Kriteriji za znanstvenu potkrijepljenost tvrdnji o funkcionalnosti	8
1.3 Tehnološki čimbenici postizanja funkcionalnosti	9
1.4 Tipovi funkcionalne hrane	11
1.5 Funkcionalni napitci.....	12
1.6 Sirovine u proizvodnji funkcionalnog napitka na bazi žitarica.....	12
1.6.1 Ječmeni slad.....	12
1.6.2 Bakterije mliječne kiseline.....	15
1.7 Tehnologija proizvodnje funkcionalnog napitka	16
1.7.1 Mljevenje slada	16
1.7.2 Ukomljavanje.....	17
1.7.3 Odvajanje sladovine od tropa	19
1.7.4 Fermentacija sladovine pomoću bakterija mliječne kiseline	20
1.8 Komponente i procesi zaslužni za funkcionalnost napitka	25
2 EKSPERIMENTALNI DIO	33
2.1 Materijali i metode	33
2.1.1 Uređaji	33
2.1.2 Grainfather sustav	33
2.1.3 Tehnologija proizvodnje.....	36
2.1.4 Određivanje sadržaja šećera/suhe tvari.....	41

2.1.5	Određivanje pH vrijednosti.....	43
2.1.6	Određivanje hlapljivih spojeva arome	44
2.1.7	Mikrobiološka analiza.....	46
3	REZULTATI I RASPRAVA.....	48
4	ZAKLJUČAK.....	53
5	LITERATURA	54

UVOD

Funkcionalni napitci su jedna od kategorija unutar koncepta funkcionalne hrane. Za shvaćanje pojma funkcionalne hrane potrebno je najprije uvidjeti kako se sam pojam nutricionizma, to jest prehrane mijenjao tijekom godina.^{1,2} Iako je pojam hrane vrlo star, vjerojatno koliko i sam čovjek, pojam prehrane se prvi put pojavljuje u 19. stoljeću.^{1,2} Prehrana je multidisciplinarno područje jer obuhvaća i primjenjuje široko dostupno znanje, uključujući temeljnu znanost o hrani i hranjivim tvarima te njihov utjecaj na fiziologiju tijela s ciljem održavanja odnosno poboljšanja stanja dobrobiti i zdravlja.^{1,2}

Tijekom 20. stoljeća otkrivene su esencijalne hranjive tvari, odnosno nutrijenti, te uspostavljeni nutritivni standardi i prehrambene smjernice.^{1,2} Stoga, glavni doprinos znanosti o prehrani u tom razdoblju bio je razvoj koncepta uravnotežene prehrane koji predstavlja unos određene kombinacije namirnica preko kojih se osiguravaju minimalni zahtjevi organizma za hranjivim tvarima potrebnim za održavanje tjelesnih funkcija, rast te sprječavanje pojave bolesti.^{1,2}

Početak 21. stoljeća moderno društvo suočilo se s novim izazovima kao što su porast populacije, produljenje životnog vijeka, nekontroliran porast troškova zdravstvene zaštite, unaprjeđenje znanstvenih spoznaja i razvoj novih tehnologija.^{1,2} Uslijed navedenog došlo je i do promjena u području znanosti o prehrani te se razvio koncept optimalne prehrane, uz zadržavanje naglaska na uravnoteženoj prehrani.^{1,2} Cilj optimalne prehrane je poboljšanje fizioloških funkcija svakog pojedinca kako bi se osigurala maksimalna dobrobit i zdravlje, a u isto vrijeme dugoročno smanjio rizik od bolesti.^{1,2} Kako bi se to postiglo potrebno je uskladiti jedinstvene biokemijske potrebe pojedinca i njegov genetski sklop s prilagođenim unosom hranjivih tvari.^{1,2} Iako je uravnotežena prehrana i dalje ključna u sprječavanju pojave bolesti povezanih s nedovoljnim, ali i prekomjernim unosom pojedinih nutrijenata, optimalna prehrana ima za cilj uspostavljanje najpovoljnijeg unosa određenih sastojaka hrane u svrhu podrške i promicanja dobrobiti i zdravlja te smanjenja rizika od pojave različitih bolesti.^{1,2} Na putu prema optimalnoj prehrani funkcionalna hrana se ističe kao jedna od sastavnica tog tipa prehrane obzirom da se temelji na znanstvenim spoznajama o interakcijama između sastojaka hrane i tjelesnim funkcijama te patološkim procesima.^{1,2}

1 OPĆI DIO

1.1 Definiranje koncepta funkcionalne hrane

Primarna uloga hrane je osigurati dovoljne količine hranjivih tvari za zadovoljavanje metaboličkih zahtjeva pojedinca te pružiti osjećaj zadovoljstva i blagostanja preko senzorskih svojstava.¹ Međutim, osim toga, hrana može moduliranjem specifičnih ciljanih funkcija u tijelu imati korisne fiziološke i psihološke učinke izvan navedenih nutritivnih značajki.¹ Naime, hrana ne samo da može pomoći u postizanju optimalnog zdravlja i razvoja nego može imati i važnu ulogu u smanjenju rizika od pojave različitih bolesti.¹

Pojam funkcionalne hrane nastao je u Japanu. Japanska vlada je još ranih 1980-ih pokrenula i financirala sustavne i opsežne istraživačke programe vezane uz funkcionalnu hranu, odnosno pozitivna stanovišta funkcionalnosti hrane, a sve kako bi pronašla rješenje za snižavanje sve viših troškova zdravstvene skrbi.^{1,3,4} Godine 1991. uspostavljen je poseban regulatorni okvir koji se odnosi na hranu za posebne zdravstvene potrebe nazvan FOSHU (engl. *Foods for Specified Health Use*). FOSHU je omogućio isticanje određenih zdravstvenih tvrdnji na proizvodima nakon odobrenja od strane Japanskog ministarstva zdravstva,⁵⁻⁷ a takva hrana je trebala zadovoljiti određene kriterije:

- a) pridonosi održavanju i poboljšanju zdravlja,
- b) zdravstvene dobrobiti hrane ili njezinih sastojaka trebaju imati jasnu zdravstvenu i nutritivnu osnovu,
- c) na temelju znanja iz medicine i nutricionizma treba odrediti odgovarajući dnevni unos za takvu hranu ili njezine sastojke,
- d) hrana ili njezini sastojci trebali bi biti sigurni za konzumaciju,
- e) sastojci hrane trebaju biti dobro definirani u smislu fizikalno-kemijskih svojstava i kvalitativnog/kvantitativnog analitičkog određivanja,
- f) ne bi trebalo biti značajnih gubitaka nutritivnih svojstava hrane u usporedbi sa sličnim tipom hrane,
- g) takva hrana bi se trebala moći konzumirati dnevno kao dio normalnog obrasca prehrane, a ne samo povremeno,

- h) proizvod bi trebao biti u obliku normalne hrane, a ne u nekom drugom obliku (npr. u obliku tableta ili kapsula),
- i) hrana i njezini sastojci ne smiju biti isključivo oni koji se koriste kao lijek.³

Kako bi dobili oznaku FOSHU proizvođači trebaju ispuniti zahtjev, odnosno priložiti dokaze koji podupiru predloženu zdravstvenu ili nutritivnu tvrdnju, preporučenu dozu funkcionalne hrane za konzumaciju, dokaz o sigurnosti hrane, opise fizikalnih i kemijskih karakteristika, korištene eksperimentalne metode i sastav. FOSHU oznaka sadrži odobrenu zdravstvenu tvrdnju, preporučeni dnevni unos, informacije o nutritivnom sastavu, smjernice o zdravoj prehrani, upozorenje o prekomjernom unosu (ako je potrebno), navedene druge mjere opreza koje se odnose na unos, pripremu i skladištenje te ostale informacije.⁸

Kao posljedica širenja pojma funkcionalne hrane 1995. godine održana je „Prva međunarodna konferencija o perspektivama Istoka i Zapada o funkcionalnoj hrani“ u organizaciji Međunarodnog instituta za znanosti o životu (engl. *International Life Sciences Institute, ILSI*).³ Usuglašeno je da funkcionalna hrana treba biti hrana koja poboljšava ili utječe na tjelesne funkcije iznad njezinih normalnih nutritivnih vrijednosti. Također je dogovoreno da ju treba razlikovati od vitamina, minerala i ostalih dodataka prehrani, te da njeni funkcionalni učinci moraju biti potkrijepljeni i znanstveno dokazani kroz laboratorijska istraživanja i ispitivanja na ljudima.

U drugoj polovici 1990.-ih pokrenut je „Usuglašeni projekt Europske komisije o znanosti o funkcionalnoj hrani u Europi“ (engl. *Functional Food Science in Europe, FUFOSSE*) u koji je bio aktivno uključen velik broj europskih stručnjaka iz područja prehrane i srodnih znanosti.^{1,2,9} Godine 1998. postignut je konsenzus o „Znanstvenim konceptima funkcionalne hrane u Europi“ prema kojem je predložena radna definicija funkcionalne hrane koja glasi:^{10,11}

„Hrana se može smatrati „funkcionalnom“ ako je na zadovoljavajući način dokazano da povoljno utječe na jednu ili više ciljanih funkcija u tijelu, izvan odgovarajućih hranjivih učinaka, na način koji je značajan za poboljšanje stanja zdravlja i dobrobiti i/ili smanjenje rizika od bolesti. Funkcionalna hrana mora ostati hrana i mora pokazati svoje učinke u količinama za koje se obično može očekivati da će se konzumirati u prehrani: to nisu tablete ili kapsule nego dio normalnog obrasca prehrane. Funkcionalna hrana može biti prirodna hrana, hrana kojoj je sastojak dodan ili hrana iz koje je sastojak uklonjen tehnološkim ili biotehnološkim putem.

To također može biti hrana u kojoj je priroda jednog ili više sastojaka promijenjena, ili hrana u kojoj je bioraspoloživost jednog ili više sastojaka promijenjena, ili bilo koja kombinacija ovih mogućnosti. Funkcionalna hrana može biti funkcionalna za sve članove populacije ili za određene skupine populacije.“

Prema *Diplock-u i sur.*¹¹ funkcionalna hrana ne može biti jedinstvena, dobro definirana cjelina. Širok raspon proizvoda je (ili će u budućnosti biti) okarakteriziran kao funkcionalna hrana. To uključuje niz sastojaka, hranjivih i ne-hranjivih tvari, koje utječu na niz tjelesnih funkcija važnih ili za dobrobit i zdravlje ili za smanjenje rizika od bolesti. Stoga funkcionalnu hranu treba shvatiti kao koncept.

Interes Japana prema funkcionalnoj hrani uvelike je pridonio razvoju svijesti o potrebi takvih proizvoda na području Europe i Sjedinjenih Američkih Država (SAD-a). Stručnjaci navedenih zemalja uvidjeli su da osim što bi funkcionalni proizvodi mogli smanjiti troškove zdravstvene skrbi stanovništva koje stari, funkcionalna hrana može dati i komercijalni potencijal prehrambenoj industriji. Međutim, istočne i zapadne kulture znatno se razlikuju u pogledu prirode funkcionalne hrane. U Japanu se funkcionalna hrana smatra posebnom kategorijom proizvoda, dok je u Europi i SAD-u riječ više o konceptu gdje funkcionalna hrana uglavnom označava dodavanje funkcionalnosti postojećem prehrambenom proizvodu, i takvi proizvodi ne čine zasebnu skupinu.³

1.2 Znanstvene osnove funkcionalne hrane

Razvoj funkcionalne hrane je svojevrstan znanstveni i tehnološki izazov koji bi se trebao temeljiti na osnovnim znanstvenim spoznajama koje su važne za razumijevanje utjecaja sastojaka hrane na ciljane funkcije u tijelu. Funkcionalna hrana sama po sebi nije jedinstvena, ali bi ju znanstveno utemeljen pristup trebao učiniti takvom. Ciljevi znanosti o funkcionalnoj hrani su stoga sljedeći:

- a) identificirati korisnu interakciju između funkcionalnog sastojka unutar hrane i jedne ili više ciljnih funkcija u tijelu i dokazati mehanizam tih interakcija (potrebno je uključiti rezultate studija provedenih *in vitro*, u staničnoj kulturi, *in vitro/ex vivo* modelu, životinjskom modelu, kao i rezultate studija na ljudima),
- b) identificirati i potvrditi markere značajne za ciljane funkcije i njihovu promjenu u sastojcima hrane,

- c) procijeniti sigurnost količine hrane ili njezinog sastojka potrebne za funkcionalnost,
- d) formulirati hipoteze koje će se ispitati u pokusima istraživanjima intervencije na ljudima kojima je cilj pokazati značajnost unosa određenih sastojaka hrane povezanih s poboljšanjem jedne ili više ciljnih funkcija, bilo izravno, bilo u smislu valjanog pokazatelja (markera) poboljšanog zdravstvenog stanja i dobiti i/ili smanjenog rizika od bolesti.¹¹

1.2.1 Tvrđnje o funkcionalnosti hrane

Glavna osnova funkcionalne hrane je njezin utjecaj na zdravlje pojedinca. Jedna od poteškoća u informiranju o dobiti funkcionalne hrane jest to što postoje različite vrste tvrdnji, a uz to se izraz „zdravstvena tvrdnja“, koji se tradicionalno koristi za priopćavanje dobiti hrane, u pojedinim zemljama različito definira.¹ Tvrđnje, bilo izravno dane na etiketi ili pakiranju prehrambenih proizvoda ili neizravno putem sekundarnih popratnih informacija, koje su sastavni dio funkcionalne hrane, moraju se temeljiti na znanstvenim informacijama i spoznajama.

Tipovi tvrdnji prema *Codex Alimentarius-u*:¹²

- a) Nutritivna tvrdnja – svaki prikaz koji navodi, sugerira ili implicira da hrana ima određena nutritivna svojstva, uključujući, ali ne ograničavajući se na energetske vrijednost i sadržaj proteina, masti i ugljikohidrata.
- b) Zdravstvena tvrdnja – svaki prikaz koji navodi, sugerira ili implicira da postoji odnos između hrane ili sastojka hrane i zdravlja.

Prema „Europskom konsenzusu o znanstvenim konceptima funkcionalne hrane“ dvije specifične vrste tvrdnji su karakteristične za funkcionalnu hranu, a to su:¹¹

- a) tip A - tvrdnje o poboljšanoj funkciji
 - tvrdnje koje se odnose na specifične blagotvorne učinke hranjivih i ne hranjivih tvari na fiziološke, psihološke funkcije i biološke aktivnosti izvan njihove utvrđene uloge u rastu, razvoju i drugim normalnim funkcijama tijela,
 - tvrdnje slične tvrdnjama o drugim funkcijama *Codex Alimentarius-a*.

b) tip B - tvrdnje o smanjenju rizika od bolesti

- tvrdnje koje se odnose na konzumaciju hrane ili sastojka hrane koja bi mogla pomoći u smanjenju rizika od bolesti zbog određenih prisutnih hranjivih i ne hranjivih tvari,
- tvrdnje slične istoimenim tvrdnjama *Codex Alimentarius-a*.

Predlagana je i dodatna, posebna tvrdnja o poboljšanom stanju zdravlja i dobrobiti, međutim, budući da ono proizlazi ili iz poboljšane funkcije (fiziološke ili psihološke) ili iz smanjenja rizika od bolesti, zaključeno je da je dovoljno obuhvaćeno tim dvjema kategorijama.¹¹

1.2.2 Markeri

Direktno mjerenje učinka hrane na zdravlje i dobrobit i/ili smanjenje rizika od bolesti često nije moguće. To može biti zato što krajnja točka, odnosno stanje zdravlja i dobrobiti nije uvijek podložno kvantificiranom mjerenju ili, u slučaju bolesti gdje je vremenski okvir za razvoj bolesti vrlo dug bilo bi neetično pratiti njezin razvoj u uvjetima kontrolirane studije.⁹ Zato se znanost o funkcionalnoj hrani temelji na znanju o ključnim procesima vezanim za postizanje optimalnog zdravlja ili razvoja bolesti kako bi identificirala markere koji se mogu koristiti za praćenje načina utjecaja hrane ili sastojka hrane na navedene procese.⁹ Pod uvjetom da su ti ključni procesi u postizanju optimalnog zdravlja ili razvoja bolesti dobro utvrđeni, a markeri točno odabrani da odražavaju taj proces, moguće je proučavati utjecaj konzumacije hrane na krajnju točku, što je u ovom slučaju poboljšano stanje zdravlja ili smanjenje rizika od bolesti, mjerenjem markera.⁹

Europska komisija je nakon FUFOSSE financirala još jedan projekt za istraživanje načina na koji se tvrdnje mogu potkrijepiti nazvan „Proces za procjenu znanstvene potpore za tvrdnje o hrani“ (engl. *Process for the Assessment of Scientific Support for Claims on Foods*, PASSCLAIM). Glavni cilj projekta PASSCLAIM bio je izrada opće metode za procjenu znanstvene potpore zdravstvenih tvrdnji koje su vezane uz hranu i sastojke hrane.¹¹ Znanstveni dokazi koji potkrepljuju zdravstvenu tvrdnju mogu se dobiti iz tri opće vrste studija:

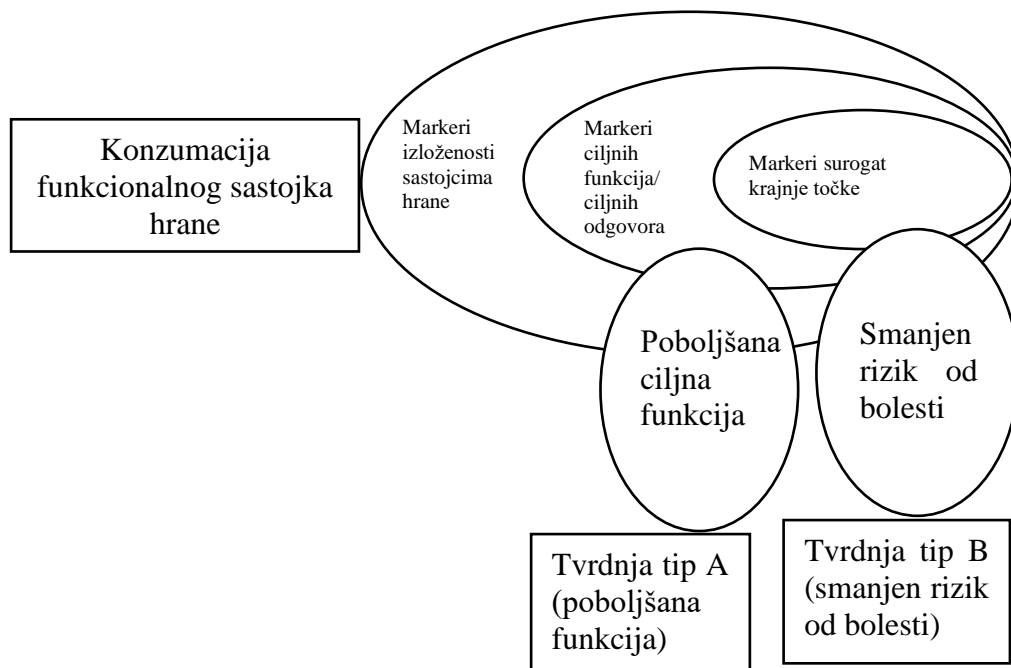
- a) kliničke ili intervencijske studije (eksperimentalna ispitivanja na ljudima),
- b) epidemiološke studije (opservacijske studije na ljudima),
- c) biokemijske, stanične ili životinjske studije.²

Dokazi dobiveni iz svih vrsta studija temelje se na markerima, stoga se razvoj funkcionalne hrane u većini slučajeva oslanja na mjerenje markera koji mogu biti biokemijske, fiziološke, bihevioralne ili psihološke prirode.¹

Klasifikacija markera:

- a) markeri izloženosti
 - oni koji procjenjuju probavljivost, sposobnost fermentacije, apsorpciju i/ili distribuciju u tkivu, ili općenito govoreći, biološku dostupnost (serumski, fekalni, urinarni ili tkivni marker),
- b) markeri ciljnih funkcija i bioloških odgovora
 - promjene u tjelesnim tekućinama ili tkivima, razinama metabolita, proteina ili enzima, ili promjene određene funkcije kao što je mišićna snaga, maksimalna potrošnja kisika, spoznaja ili crijevni tranzit,
- c) markeri surogat krajnje točke poboljšanog stanja zdravlja i dobrobiti i/ili smanjenja rizika od bolesti
 - surogat krajnja točka – specifična vrijednost koja može korelirati sa stvarnom kliničkom krajnjom točkom, ali nema nužno zajamčenu vezu,
 - predstavljaju mjerenje biološkog procesa koji se izravno odnosi na krajnju točku.²

Ako se dokazi o učincima funkcionalne hrane ili funkcionalnog sastojka hrane temelje na markeru ciljne funkcije ili biološkog odgovora (funkcionalni markeri) tada bi tvrdnja o poboljšanoj funkciji (tip A) mogla biti opravdana, dok bi tvrdnja o smanjenju rizika od bolesti (tip B) bila opravdana ukoliko bi se dokazi temeljili na markeru surogat krajnje točke bolesti (mora se pokazati da je ovaj marker značajno i dosljedno moduliran funkcionalnim sastojkom hrane da bi dokaz bio prihvatljiv).¹¹



Slika 1. Povezanost funkcionalnog sastojka, markera i specifične tvrdnje¹¹

1.2.3 Kriteriji za znanstvenu potkrijepljenost tvrdnji o funkcionalnosti

Tri su glavna razloga za procjenu znanstvene potkrijepljenosti tvrdnji o funkcionalnosti neke hrane:

- a) pružiti istinite informacije i održati povjerenje potrošača u hranu kojoj je pripisana određena tvrdnja,
- b) zadovoljiti regulatorne zahtjeve,
- c) omogućiti pošteno tržišno natjecanje.¹³

Kroz projekt PASSCLAIM predložen je i postupno usavršavan skup kriterija koji definiraju zahtjeve za procjenu kvalitete znanstvenih podataka o utjecaju hrane i sastojaka hrane na zdravlje i dobrobit:

- a) hrana ili sastojak hrane kojoj se pripisuje određeni učinak treba biti okarakterizirana,
- b) obrazloženje tvrdnje trebalo bi se temeljiti na podacima studija provedenih na ljudima, prvenstveno intervensijskih studija koje bi morale uključivati sljedeća razmatranja: ispitivane grupe bi trebale biti reprezentativne za ciljanu skupinu, odgovarajuća kontrola, odgovarajuće trajanje izloženosti i praćenja kako bi se pokazao željeni učinak, karakterizacija osnovne prehrane ispitivanih skupina i

drugih značajnih oblika načina života, količina hrane ili sastojka hrane u skladu s predviđenim obrascem konzumacije, utjecaj matrice hrane i prehrambenog konteksta na funkcionalni učinak sastojka, praćenje suradljivosti ispitanika s obzirom na unos hrane ili sastojka hrane koja se testira, statistička snaga za testiranje hipoteze,

- c) kada se prava krajnja točka određene koristi ne može izravno mjeriti, treba koristiti markere,
- d) markeri moraju biti:
 - biološki potvrđeni po tome da imaju poznatu vezu s konačnim ishodom i poznata je njihova varijabilnost unutar ciljne populacije,
 - metodološki potvrđeni s obzirom na njihove analitičke karakteristike,
- e) unutar studije ciljna varijabla trebala bi se promijeniti na statistički značajan način i promjena bi trebala biti biološki značajna za ciljnu skupinu u skladu s tvrdnjom koju treba poduprijeti,
- f) tvrdnja mora biti znanstveno potkrijepljena uzimajući u obzir sveukupnost podataka i razmatranje dokaza.¹³

1.3 Tehnološki čimbenici postizanja funkcionalnosti

Tradicionalno, cilj prerade hrane je pretvoriti sirovine u jestive, sigurne, korisne, hranjive prehrambene proizvode s poželjnim fizikalno-kemijskim svojstvima, optimalnim senzorskim svojstvima i produljenim rokom trajanja. Razvoj funkcionalne hrane, međutim, zahtijeva dodatni cilj, a to je da se funkcionalni sastojak ili doda ili optimizira, što povećava složenost samog postupka. FUFOSE je naznačio tri ključna područja koja predstavljaju tehnološke izazove u proizvodnji funkcionalne hrane, a to su:

- a) stvaranje novih funkcionalnih sastojaka u tradicionalnim i novim sirovinama te stvaranje sintezom *de novo*,
- b) optimizacija funkcionalnih sastojaka u sirovinama i hrani (npr. maksimalno očuvanje ili održavanje sastojaka, modifikacija njihove funkcije i povećanje bioraspoloživosti),
- c) efikasno praćenje količine i učinkovitosti funkcionalnih sastojaka u sirovinama i hrani.¹¹

Tablica 1. Primjeri tehnoloških izazova s mogućim rješenjima i primjerima primjene za optimizaciju funkcionalnih sastojaka hrane¹¹

Tehnološki izazovi	Moguća tehnološka rješenja	Primjeri primjene
Stvaranje funkcionalnih sastojaka iz sirovina i sintezom <i>de novo</i>	imobilizirani enzimski sustavi membranski procesi	bioaktivni peptidi antioksidansi minerali
Optimizacija sastojaka funkcionalne hrane povećavanjem njihove koncentracije u sirovini	fermentacija, tehnologija enzima ne-toplinski procesi (npr. visoki tlak)	minerali antioksidansi
Optimizacija sastojaka funkcionalne hrane modifikacijom	prilagođeni enzimski procesi	oligosaharidi (zamjena za mast)
Optimizacija sastojaka funkcionalne hrane povećanjem bioraspoloživosti	fermentacija membranski permeabilizacijski procesi	mikroorganizmi minerali
Optimizacija sastojaka funkcionalne hrane u sirovinama i hrani maksimalnim zadržavanjem	postupci inkapsulacije tehnologija sfernog pakiranja	mikroorganizmi bioaktivni peptidi antioksidansi minerali
Praćenje proizvodnje funkcionalne hrane i funkcionalnih sastojaka	senzori/markeri	mikroorganizmi minerali ugljikohidrati

1.4 Tipovi funkcionalne hrane

Funkcionalna hrana razvijena je u gotovo svim kategorijama hrane, a sa stajališta samog proizvoda funkcionalna svojstva se mogu uključiti na bezbroj različitih načina. Inovacije na području funkcionalne hrane mogu se temeljiti na novim funkcionalnim komponentama (bilo onima koje prethodno nisu bile prisutne u hrani ili onima za koje su otkrivena nova funkcionalna svojstva) ili na posebnim tehnologijama procesiranja.¹⁴ Stoga, radi jednostavnosti i praktičnosti funkcionalnu hranu možemo podijeliti u pet skupina proizvoda:^{14,15}

- a) nemodificirana hrana (engl. *whole foods*)
 - najjednostavniji oblik funkcionalne hrane,
 - hrana u svom prirodnom obliku,
 - hrana koja prirodno sadrži dovoljne količine korisnih sastojaka koji se smatraju funkcionalnim.
- b) obogaćeni proizvodi
 - proizvodi s povećanom količinom postojećih funkcionalnih sastojaka (engl. *fortified food*),
 - proizvodi kojima je dodana funkcionalna komponenta koja inače nije prisutna (engl. *enriched food*).
- c) izmijenjeni proizvodi (engl. *altered food*)
 - proizvodi u kojima je štetni sastojak (antinutrijent) uklonjen, ili je njegova količina znatno smanjena, ili je pak zamijenjen drugim sastojkom s pozitivnim učincima.
- d) poboljšani proizvodi (engl. *enhanced commodities*)
 - proizvodi kojima je jedan ili više sastojaka prirodno poboljšan ili dodan pomoću specijalnih uvjeta uzgoja biljaka, nove formule stočne hrane, genetske manipulacije ili na neki drugi način,
 - proizvodi u kojima je priroda jednog ili više sastojaka, ili njihova bioraspoloživost modificirana pomoću specijaliziranih tehnologija procesiranja (obrade) hrane.
- e) bilo koja kombinacija opisanih proizvoda.

1.5 Funkcionalni napitci

Funkcionalni napitci su najpopularnija i najraširenija kategorija funkcionalne hrane zahvaljujući svojoj praktičnosti, mogućnosti da zadovolje zahtjeve potrošača za poželjnim hranjivim tvarima i funkcionalnim komponentama, jednostavnosti distribucije te mogućnosti mijenjanja veličine, oblika i izgleda ambalaže.¹⁵ Iako vrlo rašireni, trendovi koji se odnose na funkcionalna pića više su uglavnom heterogeni, te se razvijaju i šire različitim brzinama unutar i između zemalja zbog sociodemografskih i sociokulturoloških razlika u percepciji potrošača i prihvaćanju funkcionalnih proizvoda.¹⁵ Razvoj funkcionalnog napitka je složen proces, a funkcionalnost konačnog proizvoda ovisi o odabiru početnih sirovina i sastojaka, načinu (metodi) obrade, skladištenja, isporuke i postizanja odgovarajućih senzorskih svojstava.

Podjela funkcionalnih napitaka:

- a) funkcionalni napitci na bazi mlijeka,
- b) funkcionalni napitci na bazi žitarica,
- c) funkcionalni napitci na bazi voća,
- d) funkcionalni napitci na bazi povrća,
- e) funkcionalni napitci na bazi kave,
- f) funkcionalni napitci na bazi čaja,
- g) sportski napitci,
- h) energetske napitci.

1.6 Sirovine u proizvodnji funkcionalnog napitka na bazi žitarica

1.6.1 Ječmeni slad

Ječmeni slad proizvodi se klijanjem zrna ječma odgovarajućim tehnološkim postupcima u kontroliranim uvjetima. Nakon točno određenog vremena klijanja zrno se podvrgava procesu sušenja kako bi se zaustavio sam fizički proces klijanja, ali i popratni biokemijski procesi modifikacije enzima. Svrha proizvodnje slada je aktivirati i proizvesti enzime koji mogu razgraditi staničnu stijenu endosperma, proteine, osloboditi škrob i provesti njegovu modifikaciju odnosno hidrolizu pri čemu nastaju fermentabilni šećeri.¹⁶⁻

Obično se kao faze u proizvodnji slada navode namakanje, klijanje i sušenje, međutim, proizvodnja slada uključuje više procesa od navedenih, a svaki od njih je bitan kako bi se dobio kvalitetan slad.¹⁷⁻¹⁹

a) Pred-čišćenje, čišćenje, sortiranje, skladištenje

Faza predčišćenja sastoji se od grubog prosijavanja uz koji, ili nakon kojeg, slijedi aeracija. U ovoj fazi uklanjaju se razne primjese kao što su lišće, slama, kamenje, zemlja i drugi lagani materijali. U fazi čišćenja se uklanjaju nečistoće otprilike iste veličine kao ječam, kao što su sjemenke korova, zrna drugih žitarica, te lomljena zrna. Naposljetku, ječam za proizvodnju slada razvrstava se prema veličini zrna te pohranjuje u spremnike. Zrna čiji je postotak vlage veći od 15 % potrebno je osušiti prije skladištenja. Nakon žetve, ječam prolazi kroz fazu mirovanja koja traje 6-8 tjedana ovisno o vremenskim uvjetima tijekom žetve, a nakon te faze zrno postaje potpuno spremno za klijanje. Tijekom skladištenja potrebno je omogućiti „disanje“ zrna.

b) Namakanje

Tijekom faze namakanja ječam upija vodu i bubri za jednu trećinu početne veličine zrna. Proces namakanja sastoji se od izmjeničnih razdoblja kada je zrno uronjeno u vodu („razdoblja pod vodom“) i razdoblja kada je zrno izvan vode („razdoblja odmora na zraku“). Ova kombinacija potrebna je za poticanje i održavanje učinkovitosti klijanja. Osim namakanja u vodi moguće je provoditi i prskanje. Kako bi se postigli zadovoljavajući rezultati potrebno je povećati udio vode u ječmu na približno 42-46 %, uz temperaturu vode u rasponu 10-15 °C. Uslijed upijanja vode klica ječma postaje aktivna i koristi kisik otopljen u vodi u respiratorne svrhe. Osim opskrbe ječma vodom i kisikom namakanje je od velike važnosti za uklanjanje prljavštine sa zrna.

c) Klijanje

Proces klijanja (germinacije) zrna karakterizira rast klice zrna koji se očituje rastom korjenčića te povećanjem duljine akrospore, uz popratnu promjenu sadržaja endosperma. Klijanje koje se odvija prilikom proizvodnje slada ne razlikuje se od prirodnog klijanja, barem u njegovoj prvoj fazi. Međutim, za razliku od prirodnog klijanja, tehnološki postupak klijanja se mora voditi tako da rast klice služi uglavnom za proizvodnju važnih enzima i za određenu transformaciju strukture endosperma.

Klijanje se odvija u uvjetima odgovarajuće vlage (na početku klijanja 35-40 % vlage, a za transformaciju kemijskih spojeva za vrijeme klijanja 44-48 %), temperature i kisika. Promjene u endospermu zrna okarakterizirane su razgradnjom kemijskih spojeva uslijed djelovanja enzima, ali i istovremenom sintezom novog tkiva. U početnim fazama klijanja skutelum (klicin štitić) oslobađa mnoge hidrolitičke enzime koji razgrađuju stanične stijenke, proteine, lipide i škrobne granule endosperma. Osim enzima, skutelum luči i gibereline (biljne hormone) koji stimuliraju aleuronski sloj na stvaranje i otpuštanje brojnih hidrolitičkih enzima. Od svih enzima i enzimskih kompleksa koji nastaju tijekom procesa klijanja najznačajniji su enzimi za razgradnju škroba (α -amilaza, β -amilaza, limit dekstrinaza), citolitički enzimi (endo- β -glukanaza, egzo- β -glukanaza, β -glukan solubilaza, endo-ksilanaza), enzimi za razgradnju proteina ili proteolitički enzimi (proteinaze, peptidaze), enzimi za razgradnju masti (lipaze, osobito lipoksigenaze). Cilj klijanja je dobiti potrebnu modifikaciju za određenu vrstu slada, a da se pritom na najmanju moguću mjeru svede gubitak težine uslijed aktivnosti klice.

d) Sušenje

Klijanje se prekida sušenjem kako bi se prekinule daljnje transformacije i gubitci, te smanjio sadržaj vlage u zrnu na 3-5 % pomoću struje zagrijanog zraka. Također, formiraju se spojevi zaslužni za specifičan okus i boju slada. Enzime koji su inaktivirani potrebno je očuvati kako ne bi došlo do njihova uništenja tijekom sušenja uslijed visoke temperature. Enzimi su stabilniji i otporniji na toplinu u suhim nego u vlažnim uvjetima. Ciljevi sušenja se mogu postići na način da se najprije većina vlage uklanja na relativno niskoj temperaturi (oko 50 °C), a zatim se temperatura povisuje (oko ili iznad 80 °C) kako bi se postiglo konačno smanjenje vlage kada je zrno već prilično suho. Promjene koje utječu na boju i okus slada uključuju složenu Maillardovu reakciju i Amadorijevu preraspodjelu koje uzrokuju kondenzaciju aminokiselina i reducirajućih šećera, popraćenu polimerizacijom i nizom reakcija koje dovode do obojenih, okusnih i aromatskih spojeva. Tijekom sušenja se također uklanjaju neki nepoželjni spojevi poput dimetil sulfida (DMS), sumpornog spoja odgovornog za neugodan okus po „kuhanom povrću“, na način da se tijekom sušenja prekursor DMS-a koji nastaje tijekom klijanja zrna, pretvara u slobodni, lako hlapljivi DMS. Sušenjem se, također, dobiva drobit, stabilan proizvod koji se može skladištiti dulje vrijeme i od kojeg se korjenčići nastali tijekom klijanja mogu lako odvojiti.

e) Hlađenje i uklanjanje korjenčića (vlati)

Nakon sušenja slad treba ohladiti na sobnu temperaturu što je prije moguće kako bi se spriječilo daljnje uništenje enzima te stvaranje nepoželjne boje i okusa. Korjenčići, ili vlati, se uklanjaju jer su izuzetno higroskopi te sadrže gorke tvari. Strojevi koji uklanjaju korjenčiće i čiste slad obično sadrže polako rotirajuće valjke te perforirani bubanj koji zadržava zrna, a omogućuje izbacivanje vlati koje zajedno s prašinom odnosi struja zraka.

1.6.2 Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline mogu se definirati kao skupina nesporogenih, anaerobnih, ali aerotolerantnih, kuglastih (koki) i štapićastih (bacili) Gram-pozitivnih bakterija koje proizvode mliječnu kiselinu kao glavni krajnji produkt fermentacije ugljikohidrata. U skupinu bakterija mliječne kiseline ubraja se velik broj rodova od kojih su s gledišta prehrane tehnologije najznačajniji: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella*.²⁰ Rod *Bifidobacterium* koji se često promatra u kontekstu bakterija mliječne kiseline (povijesno se smatra dijelom te skupine) i dijeli neke od njihovih tipičnih značajki, pripada porodici Actinomycetaceae za razliku od ostalih bakterija mliječne kiseline koje pripadaju porodici Clostridiaceae.²⁰ Klasifikacija bakterija mliječne kiseline u različite rodove temelji se na morfologiji, načinu fermentacije glukoze, optimalnom rastu pri različitim temperaturama, konfiguraciji proizvedene mliječne kiseline, sposobnosti rasta pri visokim koncentracijama soli i toleranciji na kiseline ili lužine.²⁰

Klasifikacija bakterija mliječne kiseline prema morfologiji:

- a) bacili (štapićaste bakterije): *Lactobacillus* i *Carnobacterium*,
- b) koki (kuglaste bakterije): svi ostali rodovi.²⁰

Klasifikacija bakterija mliječne kiseline prema načinu fermentacije glukoze u standardnim uvjetima (neograničena opskrba glukozom i čimbenicima rasta kao što su aminokiseline, vitamini, i prekursori nukleinske kiseline te ograničena raspoloživost kisika):

- a) homofermentativne – gotovo kvantitativno pretvaraju glukozu u mliječnu kiselinu (dio roda *Lactobacillus*-skupina I; skupina II, većina vrsta rodova *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*),
- b) heterofermentativne – fermentiraju glukozu u mliječnu kiselinu, etanol/octenu kiselinu, ugljikov dioksid (dio roda *Lactobacillus*-skupina III, rodovi *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*).²⁰

1.7 Tehnologija proizvodnje funkcionalnog napitka

Tehnologija proizvodnje funkcionalnog napitka obuhvaća nekoliko tehnoloških procesa, od kojih su najznačajniji ukomljavanje te fermentacija pomoću bakterija mliječne kiseline.

Postupak dobivanja sladovine obuhvaća tri procesa, a to su: mljevenje slada, miješanje mljevenog slada s vodom (ukomljavanje) i odvajanje sladovine od tropa. Način provedbe svakog pojedinog procesa uvelike utječe kako na sljedeći korak u postupku dobivanja sladovine, tako i na krajnji produkt.

1.7.1 Mljevenje slada

Mljevenje je mehanički proces čija je svrha usitniti slad, odnosno slomiti zrna slada, tako da endosperm bude izložen djelovanju enzima tijekom ukomljavanja. Iako se mljevenje čini kao jednostavan postupak potrebno je postići optimalnu veličinu čestica zrna slada ovisno o načinu na koji će se kasnije sladovina odvajati od tropa. Ako su zrna nedovoljno samljevena enzimima je potrebno više vremena da dopru do endosperma što može rezultirati nepotpunom razgradnjom škroba te slabim prinosom ekstrakta. Nasuprot tome, ako su zrna previše usitnjena te imaju strukturu brašna, doći će do brže i potpunije razgradnje škroba, ali takva struktura zrna otežava proces odvajanja sladovine. Također, previše samljevena ljuska zrna dovodi do ekstrakcije tanina u sladovinu što može rezultirati astrigentnošću.^{21,22} Tijekom mljevenja poželjno je zadržati ljusku slada što više netaknutom kako bi mogla poslužiti kao sloj filtera pri odvajanju sladovine. Stoga, mljevenje slada uvijek predstavlja kompromis između potrebe za što finijim mljevenjem kako bi se postigao što veći prinos i zadržavanjem dovoljno fragmenata ljuske kako bi se omogućilo lakše odvajanje sladovine.²¹ Postoje različite izvedbe mlinova koji se mogu

koristiti za provedbu ovog procesa, poput mlinova s valjcima (2 valjka – 1 par, 4 valjka – 2 para ili 6 valjaka – 3 para), mlinovi s diskovima i mlinovi čekićari. Osim suhog načina mljevenja moguće je provesti i mokro mljevenje. Tom tehnikom nastoji se minimizirati oštećenje ljuske (ljuska postaje savitljiva) i maksimizirati smanjenje endosperma vlaženjem zrna prije nego što uđe u mlin.

1.7.2 Ukomljavanje

Ukomljavanje je miješanje mljevenog slada s vodom te ujedno najvažniji postupak u procesu proizvodnje sladovine. Uslijed miješanja određenog omjera mljevenog slada i vode određene temperature enzimi nastali tijekom klijanja postaju aktivni i pomažu u pretvorbi netopljivog materijala u topljivi, to jest omogućuju dobivanje ekstrakta. Netopljivi materijal čine škrob, celuloza, dio visokomolekularnih proteina i drugih spojeva, dok topljivi uključuje šećere, dekstrine, anorganske spojeve (minerale) i pojedine proteine.¹⁷ Uz količinu (kvantitetu) važna je i kvaliteta ekstrakta (otopljenih tvari) jer su neki spojevi nepoželjni (tanini), dok su drugi posebno poželjni (određeni šećeri te produkti razgradnje proteina).¹⁷

Kominu je potrebno držati na odabranoj temperaturi (ili na uzastopnim različitim temperaturama) unaprijed određeno vrijeme kako bi se enzimima omogućila razgradnja. Najvažnije svojstvo enzima je njihova sposobnost kidanja kemijskih veza, a njihova aktivnost najviše ovisi o temperaturi (karakteristika svakog enzima) i pH vrijednosti (zbog promjene trodimenzionalne strukture enzima). Najvažniji procesi razgradnje tijekom postupka ukomljavanja su:^{17,22}

a) Razgradnja škroba

Odvija se u tri faze:

1. želatinizacija

- škrob u kontaktu s vrućom vodom bubri te na koncu puca uslijed čega nastaje viskozna ljepljiva otopina (škrobni ljepak),
- škrobne molekule više nemaju strukturu škrobne granule čime postaju dostupnije djelovanju enzima,
- temperatura želatinizacije je oko 60 °C.

2. likvefakcija

- podrazumijeva smanjenje viskoznosti želatiniziranog škroba djelovanjem α -amilaze,

- dugi lanci glukoze u škrobu (amiloza i amilopektin) se uz pomoć α -amilaze razlažu na kraće lance što rezultira smanjenjem viskoznosti).

3. saharifikacija

- α -amilaza razlaže lance amiloze i amilopektina pri čemu nastaju dekstrini koji se sastoje od 7 do 12 glukoznih jedinica,

- β -amilaza cijepa jedinice glukoze od nereducirajućeg kraja lanca tako da uglavnom nastaju dvije molekule glukoze, tj. maltoza, ali uslijed različite duljine lanca mogu nastati i drugi šećeri poput glukoze i maltotrioze,

- u oba slučaja cijepanje se zaustavlja na 2-3 glukoze jedinice od 1,6 glikozidne veze amilopektina, jer ni α - ni β -amilaza ne mogu razlagati 1,6 veze, uslijed čega nastaju dekstrini,

- saharifikacija podrazumijeva potpunu razgradnju škroba do maltoze i dekstrina djelovanjem amilaza.

- α -amilaza cijepa duge škrobne lance u manje dekstrine, djeluje optimalno pri 65-75 °C i pH 5,6-5,8;
- β -amilaza cijepa dekstrine od nereducirajućeg kraja pri čemu nastaje maltoza, ali i glukoza i maltotrioza, djeluje optimalno pri 60-65 °C i pH 5,4-5,6.

b) Razgradnja β -glukana

β -glukani zajedno s proteinima izgrađuju stanične stijenke unutar zrna te ih je potrebno razgraditi kako bi molekule škroba postale dostupne. Enzimi koji razgrađuju β -glukane su: endo- β -1,4-glukanaza (optimalna temperatura 40-45 °C i pH 4,5-4,8), endo- β -1,3-glukanaza (40-45 °C i pH 4,6) i β -glukan-solubilaza (62-65 °C i pH 6,8).

c) Razgradnja proteina

Pri 45-50 °C formiraju se produkti razgradnje proteina niske molekularne težine kao što su peptidi i aminokiseline, dok se pri 60-70 °C formiraju produkti razgradnje proteina visoke molekularne težine. Enzimi koji razgrađuju proteine (proteolitički enzimi) su: endopeptidaza (optimalna temperatura 45-50 °C), karboksipeptidaza (50 °C), aminopeptidaza (45 °C) i dipeptidaza (45 °C).

Ovisno o načinu postizanja željene temperature ukomljavanja razlikujemo dvije metode:^{17,23}

a) infuziju

- postizanje temperature ukomljavanja dodatkom vode više temperature ili direktnim grijanjem komine,
- obzirom na trajanje vremena zadržavanja na određenoj temperaturi (engl. *temperature rest*) razlikuju se izotermna (jednostupanjska) infuzija i temperaturno programirana (višestupanjska) infuzija.

b) dekokciju

- ukomljavanje kod kojeg se željena temperatura (ili temperature) postiže odvajanjem dijela komine koji se kuha u posebnoj posudi te se potom ponovo miješa s glavnom kominom uslijed čega dolazi do povišenja temperature,
- obzirom na to koliko se puta dio komine odvaja i kuha te ponovno vraća u glavnu kominu razlikuju se jednostruka, dvostruka i trostruka dekokcija.

1.7.3 Odvajanje sladovine od tropa

Nakon završetka procesa ukomljavanja komina se sastoji od otopljenih i neotopljenih tvari. Vodena otopina u kojoj se nalaze otopljene tvari naziva se sladovina, a neotopljene tvari nazivaju se trop. Trop čine uglavnom ljuska i klica slada te ostali materijali koji nisu prešli u otopinu tijekom ukomljavanja i on predstavlja sloj filtera preko kojeg se odvaja sladovina, osim ako je u postupku mljevenja slad pretvoren u brašno kada se koriste uređaji s filterima. Kada bi se sladovina samo ocijedila od tropa značajna količina ekstrakta ostala bi unutar matriksa zrna. Stoga se radi bolje iskoristivosti uglavnom provodi ispiranje tropa dodatnom količinom zagrijane vode. Zagrijavanjem vode za ispiranje dolazi do denaturacije proteina i prestanka enzimatske aktivnosti te se postiže bolja ekstrakcija. Prilikom ispiranja mogu se javiti dva problema; prvi je da prekomjernim ispiranjem sladovina postaje manje koncentrirana, a drugi da ukoliko se ne kontrolira pH vode za ispiranje može doći do ekstrakcije tanina iz ljuske.²⁴

Iako postoje različite metode odvajanja i ispiranja sladovine od tropa, prema *Mosher-u i Trantham-u*²⁴ razlikuju se tri osnovna postupka:

a) odvajanje bez ispiranja

- najjednostavniji postupak odvajanja u kojem se sladovina ocijedi kroz filterski sloj tropa bez ispiranja dodatnom količinom vode,
- kod ovog postupka mali je prinos ekstrakta, ali ne dolazi do razrjeđenja sladovine ili ekstrakcije tanina.

b) kontinuirano ispiranje

- postupak u kojem je brzina ispiranja jednaka brzini istjecanja sladovine te tijekom kojem se razina vode uvijek drži iznad filterskog sloja tropa,
- kod ovog postupka veći je prinos ekstrakta, ali dolazi do razrjeđenja i moguće ekstrakcije tanina.

c) šaržno ispiranje

- postupak u kojem se najprije sladovina samostalno cijedi preko filterskog sloja tropa te se dobije prva (glavna) sladovina koja je koncentriranija, a zatim se vrši ispiranje tropa dodavanjem dodatne količine vode pri čemu se dobije druga sladovina koja je razrijeđenija,
- moguće je miješati prvu i drugu sladovinu ili ih koristi odvojeno.

1.7.4 Fermentacija sladovine pomoću bakterija mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline čine raznoliku skupinu mikroorganizama koji su se od davnina koristili za fermentaciju u pripremi i konzerviranju hrane.^{25,26} Fermentacija prehrambenih proizvoda tradicionalno se provodila pomoću autohtone mikroflore prisutne na proizvodima među kojima su prevladavale bakterije mliječne kiseline. Međutim, u cilju jednostavne kontrole i ponovljivosti kvalitete konačnog proizvoda, u prehrambenoj industriji se uobičajeno koriste definirane starter kulture.²⁷ Primarni razlog provođenja fermentacija bio je poboljšanje organoleptičkih svojstava te produljenje roka trajanja proizvoda.²⁵ No, razvojem znanosti uočeno je da pojedini rodovi bakterija mliječne kiseline kao i drugih bakterija, uz navedene svojstva, fermentacijom poboljšavaju nutritivna svojstva proizvoda, proizvode komponente koje imaju pozitivan utjecaj na ljudski organizam, sprječavaju rast patogenih mikroorganizama te djeluju na smanjenje antinutritivnih sastojaka.^{25,26} Također je uočeno da pojedini rodovi bakterija

mliječne kiseline pripadaju skupini probiotičkih bakterija koje kad se konzumiraju imaju pozitivan utjecaj na organizam čovjeka.^{25,27}

Bakterije mliječne kiseline imaju fermentativni metabolizam, a primarni izvor njihove metaboličke energije dobiva se fosforilacijom na razini supstrata u obliku adenozin trifosfata (ATP-a).²⁸ Zbog relativno jednostavnog metabolizma imaju visoke zahtjeve u pogledu nutritivnog sastava supstrata u kojem mogu opstati i rasti. Uglavnom su im uz ugljik kao izvor energije potrebne i različite aminokiseline, vitamini, nukleinske kiseline i minerali.²⁸ Sladovina predstavlja povoljan medij za rast bakterija mliječne kiseline upravo zbog svog sastava. Otopljene tvari sladovine uglavnom se sastoje od približno 90-92 % ugljikohidrata od kojih 75 % čine fermentabilni šećeri (najvećim dijelom maltoza, zatim glukoza, fruktoza, saharoza, maltotrioza, maltotetroza i mali dio pentoza), a ostalih 25 % čini nefermentabilna frakcija ekstrakta (uglavnom dekstrini i β -glukani), 4-5 % dušičnih spojeva (većinom u obliku aminokiselina, peptida i proteina, a malim dijelom u obliku nukleinskih kiselina i njihovih razgradnih produkata), a ostatak čini širok spektar organskih (lipidi, polifenoli, vitamini, organski spojevi sumpora) i anorganskih (minerali, anorganski spojevi sumpora) spojeva.²⁹

Primarna metabolička aktivnost bakterija mliječne kiseline je fermentacija ugljikohidrata povezana s fosforilacijom na razini supstrata zbog njihove potrebe za energijom i ugljikom.^{20,30}

a) fermentacija heksoza

Postoje dva glavna puta za fermentaciju glukoze koju provode bakterije mliječne kiseline.

Prvi se naziva glikoliza (Embden-Meyerhof-Parnasov put), a karakterizira ju nastajanje fruktoza-1,6-difosfata (FDP) kojeg cijepa enzim fruktoza-difosfat aldolaza do glicerlaldehid-3-fosfata (GAP) i dihidroksi-aceton-fosfata (DHAP).²⁰ GAP (i DHAP putem GAP-a) se potom pretvara u piruvat u metaboličkoj sekvenci koja uključuje fosforilaciju na razini supstrata na dva mjesta. U normalnim uvjetima (dostatna količina šećera i ograničen pristup kisiku) piruvat se reducira u mliječnu kiselinu djelovanjem nikotinamid adenin dinukleotid (NAD^+) zavisne lakat dehidrogenaze (nLDH), čime se ponovno oksidira reducirani oblik nikotinamid adenin dinukleotida (NADH) nastao tijekom ranijih koraka glikolize. Mliječna kiselina je jedini krajnji produkt glikolize te se zbog toga taj način fermentacije glukoze naziva homolaktička fermentacija.

U teoriji, homolaktičkom fermentacijom od 1 mola glukoze nastaju 2 mola mliječne kiseline uz 2 mola energije u obliku adenozin trifosfata (ATP-a):

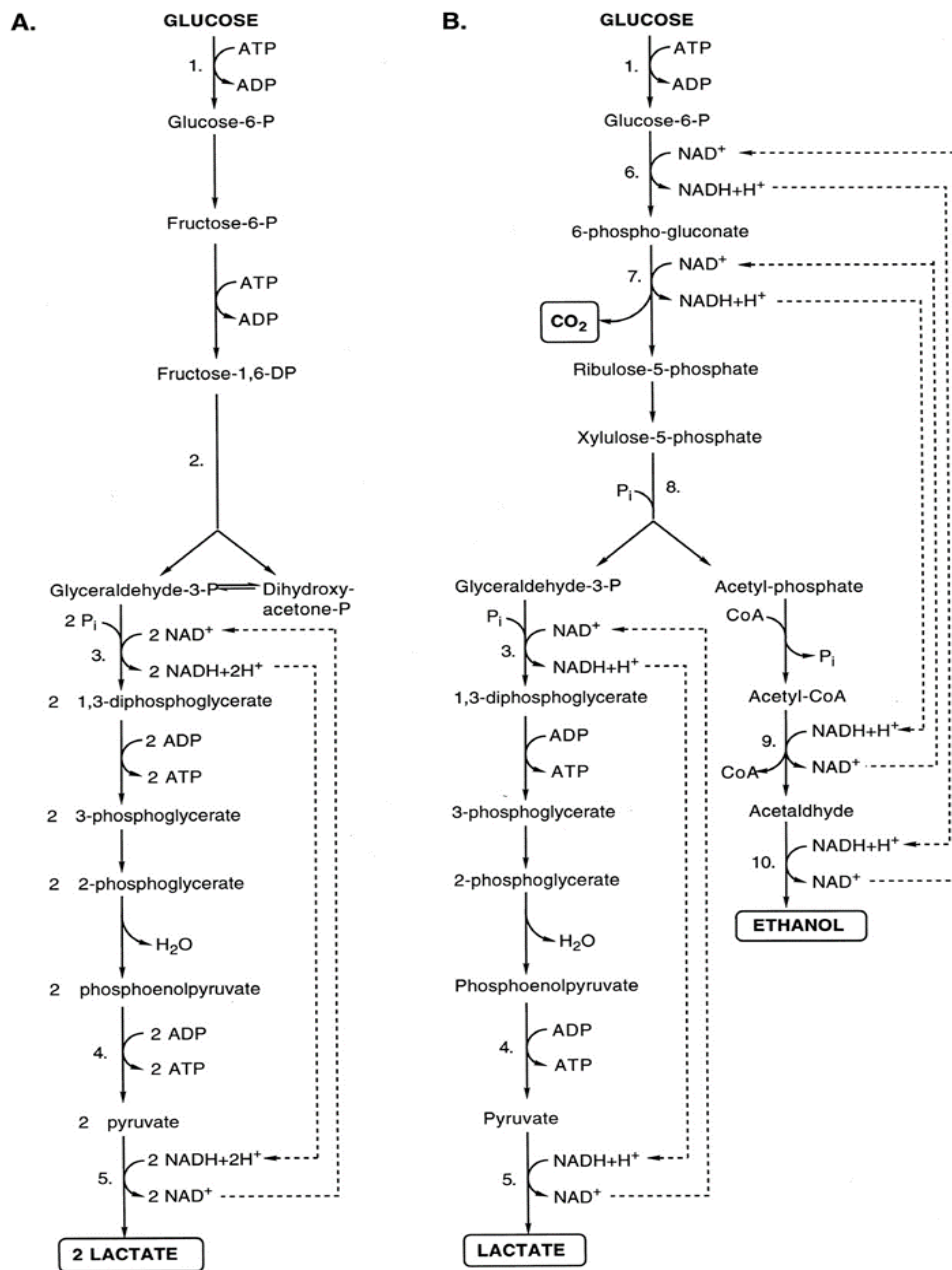


Drugi put se prema *Laxelsson-u*²⁰ naziva put 6-fosofoglukonata/fosfoketolaze (6-PG/PK) kojeg karakteriziraju početni koraci dehidrogenacije uz stvaranje 6-fosfoglukonata, nakon čega slijedi dekarboksilacija pri čemu nastaje pentoza-5-fosfat i CO₂. Zatim enzim fosfoketolaza cijepa preostali pentoza-5-fosfat na GAP i acetil-fosfat. GAP se metabolizira na isti način kao i kod glikolize pri čemu nastaje mliječna kiselina, a acetil-fosfat se preko acetil koenzima A i acetaldehida reducira u etanol ako nije dostupan dodatni elektron-akceptor. Prisutnost ili odsutnost vanjskog elektron-akceptora odlučit će hoće li se formirati etanol (bez stvaranja dodatnog ATP-a) ili acetat (uz stvaranje dodatnog ATP-a), ili i jedan i drugi spoj u različitim omjerima. U prisutnosti vanjski elektron-akceptora kao što su kisik, piruvat, citrat, glicerol ili fruktoza zbog stvaranja dodatne energije u obliku ATP-a (time i bolje iskoristivosti glukoze) acetil-fosfat (ili dio acetil-fosfata) se pretvara u acetat.^{20,31} Budući da fermentacijom glukoze ovim putem uz mliječnu kiselinu nastaju i drugi produkti dobila je naziv heterolaktička fermentacija. Heterolaktičkom fermentacijom 1 mola glukoze nastaju po 1 mol mliječne kiseline, etanola i ugljikovog dioksida (CO₂) uz 1 mol energije u obliku ATP-a:



Ostale heksoze, kojima pripada i fruktoza, ulaze u glavne puteve fermentacije glukoze na razini glukoza-6-fosfata ili fruktoza-6-fosfata nakon izomerizacije i/ili fosforilacije. Dio fruktoze se također reducira u manitol (šećerni alkohol) pomoću NAD⁺ zavisne manitol dehidrogenaze.

Općenito, izraz homolaktičke bakterije mliječne kiseline koristi se za one bakterije koje fermentiraju glukozu putem glikolize, dok se izraz heterolaktičke bakterije mliječne kiseline koristi za one bakterije koje fermentiraju glukozu putem 6-PG/PK.²⁰ Međutim, treba napomenuti da glikoliza može dovesti do heterolaktičke fermentacije (što znači da je uz mliječnu kiselinu nastaje još krajnjih produkata) pod određenim uvjetima (ograničene količine ugljika, višak ugljika iz sporo metabolizirajućih šećera, prisutnost organskih elektron-akceptora, višak piruvata) pri čemu uz laktate (mliječnu kiselinu) nastaju formijati (mravlja kiselina), acetati (octena kiselina), etanol, acetoin i/ili CO₂ te da pojedine bakterije koje se smatraju homofermentativnima koriste put 6-PG/PK kada metaboliziraju određene supstrate.^{20,31}



Slika 2. Glavni putevi fermentacije glukoze: (A) homolaktička fermentacija (glikoliza, Embden-Meyerhof-Parnasov put); (B) heterolaktička fermentacija (put 6-fosfoglukonata/fosfoketolaze). Enzimi u glavnim putevima fermentacije glukoze: 1. glukokinaza; 2. fruktoza-1,6-difosfat aldolaza; 3. gliceralhid-3-fosfat dehidrogenaza; 4. piruvat kinaza; 5. laktat dehidrogenaza; 6. glukoza-6-fosfat dehidrogenaza; 7. 6-fosfoglukonat dehidrogenaza; 8. fosfoketolaza; 9. acetalhid dehidrogenaza; 10. alkohol dehidrogenaza.²⁰

b) fermentacija pentoza

Specifične permeaze unose pentoze unutar stanica bakterija mliječne kiseline gdje se one fosforiliraju i pretvaraju u ribuloza-5-fosfat ili ksiluloza-5-fosfat pomoću epimeraza ili izomeraza.²⁰ Ti se spojevi zatim mogu metabolizirati prema tome kako je opisano u donjem dijelu puta 6-PG/PK. Prema tome samo heterolaktičke bakterije mliječne kiseline trebale bi fermentirati pentoze, međutim, gotovo sve bakterije mliječne kiseline mogu ih fermentirati na isti način kako to čine i same heterolaktičke bakterije. Heterolaktička fermentacija pentoza rezultira drugačijim krajnjim produktima u odnosu na fermentaciju glukoze. Ne stvara se CO₂, a budući da nisu potrebni koraci dehidrogenacije da bi se došlo do intermedijarnog ksiluloza-5-fosfata, redukcija acetil-fosfata u etanol postaje suvišna. Umjesto toga enzim acetat kinaza koristi acetil-fosfat u koraku fosforilacije na razini supstrata dajući acetat i energiju u obliku ATP-a. Fermentacija pentoza tako dovodi do ekvimolarnih količina mliječne i octene kiseline:



c) fermentacija disaharida i oligosaharida

Disaharide (maltoza, saharoza) i oligosaharide (maltotrioza, maltotetroza) bakterije mliječne kiseline preuzimaju uz pomoć specifičnih permeaza, a zatim ih unutar stanice pomoću enzima cijepaju u monosaharide koji se fosforiliraju i ulaze u već spomenute glavne puteve fermentacije.^{20,30}

Obzirom na opisane načine fermentacije ugljikohidrata bakterije mliječne kiseline se mogu podijeliti u tri metaboličke kategorije. U prvu kategoriju spadaju dio roda *Lactobacillus* (skupina I) i neke pojedinačne vrste iz ostalih rodova koje su obligatno homofermentativni, što znači da fermentiraju šećere samo glikolizom.²⁰ Druga kategorija uključuje dio roda *Lactobacillus* (skupina III) i rodove *Leuconostoc*, *Oenococcus* i *Weissella* koji su obligatno heterofermentativni, što znači da fermentiraju šećere samo putem 6-PG/PK.²⁰ Razlika između ove dvije kategorije je prisutnost ili odsutnost ključnih enzima glikolize i puta 6-PG/PK, a to su fruktoza-difosfat aldolaza (FDP aldolaza) i fosfoketolaza. Obligatno homofermentativne vrste posjeduju enzim FDP aldolazu, a nemaju fosfoketolazu, dok za obligatno heterofermentativne vrste vrijedi obrnuto. Treću kategoriju čine preostale vrste bakterija mliječne kiseline, odnosno dio roda *Lactobacillus* (skupina II) i većina vrsta rodova *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* i *Vagococcus* koje su fakultativno

heterofermentativne.²⁰ Karakteristika takvih bakterija je da kao i homofermentativne bakterije imaju enzim FDP aldolazu te zbog toga fermentiraju heksoze putem glikolize, dok u prisutnosti pentoza sintetiziraju fosfoketolazu što rezultira heterolaktičkom fermentacijom.

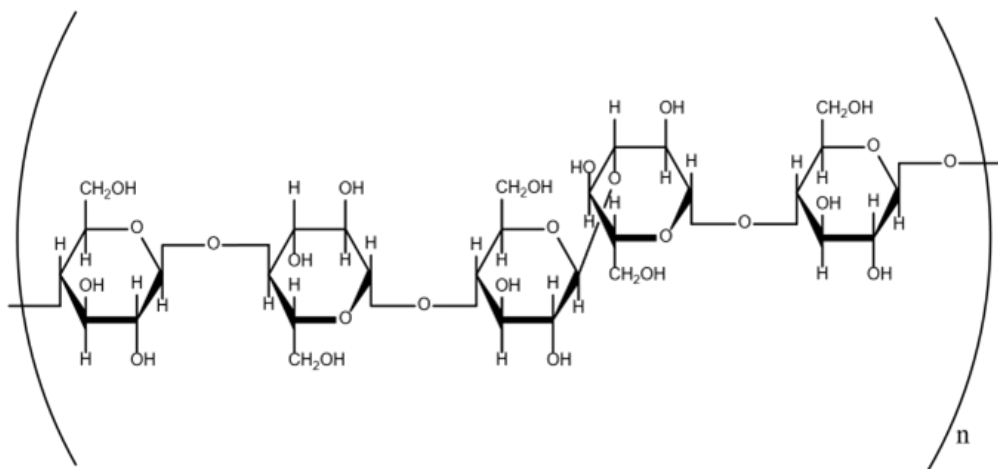
Druga važna metabolička aktivnost bakterija mliječne kiseline je razgradnja proteina (proteoliza) i aminokiselina. Utvrđeno je da su bakterije mliječne kiseline auksotrofi, odnosno da ne mogu same sintetizirati aminokiseline potrebne za rast, stoga im je potreban vanjski izvor aminokiselina.^{20,31} Katabolizam aminokiselina je zaslužan za širok niz hlapljivih spojeva i bioaktivnih peptida. Zbog potrebe za aminokiselinama bakterije mliječne kiseline imaju razvijen proteolitički sustav čije se komponente mogu podijeliti u tri skupine na temelju funkcije.³¹ Prvu komponentu sustava čine proteinaze, enzimi koji cijepaju proteine u peptide. Drugu komponentu čini transportni sustav koji prenosi produkte razgradnje kroz citoplazmatsku membranu, a treću komponentu čine peptidaze koje razgrađuju peptide u slobodne aminokiseline. Aminokiseline se dalje razgrađuju metaboličkim putevima koji ovise o soju bakterije čime dolazi do nastanka hlapljivih spojeva odgovornih za profil arome fermentiranih proizvoda. Glavni izvor spojeva odgovornih za okus su aminokiseline razgranatog lanca-BCAA (valin, izoleucin i leucin), aromatske aminokiseline (tirozin, triptofan i fenilalanin) te aminokiseline koje sadrže sumpor (metionin i cistein). Aminokiseline razgranatog lanca i aminokiseline koje sadrže sumpor mogu se razgraditi najprije do α -ketokiselina koje se dalje mogu pretvoriti u aldehide, karboksilne kiseline i hidrosikiseline. Osim važnosti proteolitičkih enzima u konačnim organoleptičkim svojstvima fermentiranih proizvoda, poznato je da određeni sojevi bakterija mliječne kiseline (*Lactobacillus helveticus* CP790, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* SS1, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* FT4) mogu osloboditi bioaktivne peptide koji su šifrirani u proteinima, a za koje se smatra da imaju ulogu u promicanju zdravlja.³¹

1.8 Komponente i procesi zaslužni za funkcionalnost napitka

Sirovina za dobivanje slada, a time i sladovine, je ječam. Ječam je žitarica iz porodice trava Poaceae (Gramineae) te pripada rodu *Hordeum*.³² Iako se od davnina koristio kao jedna od najvažnijih žitarica za prehranu, danas se zrno ječma rijetko upotrebljava u te svrhe, osim za proizvodnju alkoholnih pića poput piva.³² Razlog tome je sve veća upotreba drugih žitarica poput pšenice, riže i kukuruza. U novije vrijeme

otprilike dvije trećine usjeva ječma koristi se kao stočna hrana, ostatak za proizvodnju slada, a vrlo malo direktno kao hrana.³² Ječam posjeduje funkcionalne sastojke u obliku prehrambenih vlakana i fitokemikalija kao što su fenolne kiseline, flavonoidi, lignani, tokoli, fitosteroli i folati.³³

Prehrambena vlakna čine neškrobni polisaharidi koji su sastavni dio stanične stijenke ječma poput β -glukana, arabinosilana, celuloze, fruktana i glukomanana.³² Od navedenih prehrambenih vlakana β -glukani su najvažniji u smislu ljudske prehrane i zdravstvenih dobrobiti. β -glukan je polisaharid sastavljen od linearnih lanaca β -D-glukoze povezanih β -(1,3), (1,4)-D-glikozidnim vezama.³⁴



Slika 3. Struktura β -glukana u žitaricama³⁵

β -glukan se povezuje sa smanjenjem rizika od nastanka kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa.^{36,37} Ti se učinci temelje na snižavanju kolesterola kao i smanjenju postprandijalnih vrijednosti glukoze.³⁶ Pozitivni zdravstveni učinci β -glukana povezani su s izrazitom viskoznošću u vodenim otopinama.³⁶

Mehanizam djelovanja na snižavanje kolesterola je opisan na način da konzumacija β -glukana povećava viskoznost kimusa (gusta kašasta tvar, nastala miješanjem hrane i želučanih sokova koja prelazi iz želuca kroz pilorični otvor u dvanaesnik, a zatim se peristaltičkim kretanjama prenosi duž tankog i debelog crijeva)³⁸ u gornjem dijelu gastrointestinalnog trakta što dovodi do povećanja vezanja žučnih kiselina i njihovog naknadnog izlučivanja. Žučne kiseline sintetiziraju se *de novo* pomoću kolesterol-7 α -hidroksilaze, pri čemu kolesterol u plazmi služi kao supstrat za novo sintetizirane žučne kiseline što dovodi do smanjenja kolesterola u krvi.³⁶

Europska agencija za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*, EFSA) je 2011. godine iznijela „Znanstveno mišljenje o potkrijepljenosti zdravstvene tvrdnje o povezanosti β -glukana iz ječma i snižavanja kolesterola u krvi i smanjenja rizika od (koronarne) bolesti srca u skladu s člankom 14. Uredbe (EZ) br. 1924/2006“.

Viskoznost β -glukana također je odgovorna za smanjenje postprandijalne razine glukoze u krvi na način da se smanjuje mogućnost miješanja kimusa s probavnim enzimima u želudcu, a uz to se i odgađa pražnjenje želuca što dovodi do povećane zasićenosti i manjeg unosa hrane.³⁶ β -glukan osim djelovanja na smanjenje rizika od bolesti ima i svojstva prebiotika. Prebiotik se definira kao „neprobavljiv sastojak hrane koji blagotvorno utječe na domaćina selektivnim poticanjem rasta i/ili aktivnosti jedne ili ograničenog broja bakterija u debelom crijevu“.³⁹ β -glukan fermentiraju bakterije u debelom crijevu što potiče njihov rast i razvoj uz nastajanje kratkolančanih masnih kiselina kao što su acetat, propionat i butirat.³⁶ *Arena i sur.*⁴⁰ su prema studiji koju su proveli zaključili da „ β -glukani iz ječma poboljšavaju stopu rasta testiranih probiotičkih bakterija (*Lactobacillus acidophilus* LA5, *Lactobacillus plantarum* WCFS1, *Lactobacillus plantarum* CETC i *Lactobacillus fermentum* CECT 8448) u uvjetima bez stresa i što je još važnije nakon izlaganja *in vitro* simulaciji probavnog trakta, sa selektivnim utjecajem na vrste *Lactobacillus plantarum*“.

Fitokemikalije u ječmu sadržane su u različitim koncentracijama koje obično određuju genotipski ili okolišni čimbenici, ili interakcija oba čimbenika te mogu postojati u slobodnim, konjugiranim ili vezanim oblicima.³³

Fenolni spojevi u ječmu, u koje spadaju fenolne kiseline (derivati benzojeve i cimetine kiseline među kojim su najzastupljenije ferulinska i *p*-kumarinska kiselina), flavonoidi (flavanoli, antocijani, proantocijanidini) i lignani (7-hidroksimatairesinol, siringaresinol, lariciresinol) imaju snažno antioksidativno djelovanje povezano s njihovom sposobnošću hvatanja slobodnih radikala.^{33,41}

Tokoferoli i tokotrienoli, odnosno tokoli, aktivni su spojevi vitamina E od kojih se svaki pojavljuje u četiri oblika nazvana α -, β -, γ - i δ -vitameri. Svi tokoli pokazuju antioksidativnu aktivnost, dok tokotrienoli uz navedeno svojstvo pokazuju i svojstva inhibicije sinteze kolesterola, neuroprotekcije i antikarcinogena svojstva.⁴¹ Karakteristika ječma je da posjeduje svih osam biološki aktivnih vitamera.^{33,41}

Fitosterol, ili biljni sterol, (sitosterol, kampesterol) važna je strukturna komponenta biljne membrane po strukturi slična kolesterolu, ali različite konfiguracije.³³

Pojedine studije pokazale su da unos biljnih sterola može imati pozitivan učinak na smanjenje razine kolesterola te da pruža zaštitu od kardiovaskularnih bolesti.^{33,41}

Folat je vitamin B koji djeluje kao koenzim u nekoliko pojedinačnih reakcija prijenosa ugljika u metabolizmu nukleinskih kiselina i aminokiselina.⁴¹ Pojavljuje se u nekoliko vitamina, reduciranih derivata folne kiseline, koji uglavnom postoje kao poliglutamati u žitaricama, te se povezuje sa sprečavanjem defekata neuralne cijevi kod djece.⁴¹

Sirove žitarice, uključujući i ječam, karakterizira relativno nizak udio proteina, nedostatak određenih aminokiselina (poput lizina), mala dostupnost škroba, te postojanje određenih antinutritivnih sastojaka.⁴² Zbog različitih biokemijski i enzimatski induciranih promjena u sirovinama uslijed proizvodnje sladovine i fermentacije dolazi do poboljšanja nutritivnih i funkcionalnih kao i nastanka novih sastojaka, te dolazi do razgradnje sastojaka koji imaju antinutritivna svojstva.⁴³ U fazi klijanja tijekom postupka pripreme slada pokreće se enzimska aktivnost unutar zrna ječma što dovodi do razgradnje proteina, ugljikohidrata i lipida u jednostavnije oblike čime se povećava bioraspoloživost hranjivih tvari.⁴² Što se tiče povezanosti antioksidativne aktivnosti i koncentracije fenolnih spojeva, kao i koncentracije folata, s postupkom pripreme slada, postoje kontradiktorni rezultati gdje se u pojedinim studijama navodi njihovo povećanje uslijed procesa proizvodnje sladovine, dok se u drugima navodi obrnuto.⁴⁴

Tijekom postupka pripreme slada dolazi do djelomične razgradnje β -glukana uslijed prisustva enzima koji ih hidroliziraju, ali i do razgradnje fitinske kiseline (inozitol heksakisfosfat-IP6) koja posjeduje antinutritivna svojstva.^{42,44} Antinutritivna svojstva fitinske kiseline povezana su njezinim kelirajućim učinkom što dovodi do negativnih posljedica poput smanjene apsorpcije minerala, slabije probavljivosti proteina i inhibicije enzima. S druge strane, reducirani oblici fitinske kiseline (IP6) kao što su IP5, IP4 i IP3 smatraju se funkcionalnim bioaktivnim sastojcima.⁴³ 1,2,6 inozitol trifosfat (IP3) proučavan je u pogledu prevencije dijabetesa, liječenja kroničnih upala i kardiovaskularnih bolesti.⁴³

Tijekom procesa sušenja u postupku proizvodnje slada zbog povišene temperature dolazi do Maillardove reakcije (reakcija između šećera i aminokiselina) uslijed čega kao krajnji produkti nastaju melanoidini. Melanoidini se dijele na melanosaharide koji su negativno nabijeni i lako topljivi u vodi te melanoproteine koji su ne topljivi u vodi.⁴⁵ Prema *Sharma i sur.*⁴⁵ nekoliko je studija pokazalo da melanoidini sprječavaju

peroksidaciju lipida, oksidativno oštećenje DNA te imaju antimikrobna, antihipertenzivna, antialergijska i prebiotička svojstva.

Fermentacija pomoću bakterija mliječne kiseline predstavlja prirodan način koncentriranja i poboljšanja hranjivih tvari, sinteze funkcionalnih sastojaka, razgradnje negativnih sastojaka poput antinutrijenata te poboljšanja senzorskih svojstava.⁴⁶ Bakterije mliječne kiseline proizvode različite metabolite poput organskih kiselina, antimikrobnih peptida i bakteriocina koji sprečavaju rast bakterija kvarenja i patogenih bakterija, te na taj način utječu na sigurnost i produljenje roka trajanja proizvoda.⁴⁷ Također, proizvode i metabolite koji onemogućavaju rast gljivica i plijesni time sprječavajući pojavu mikotoksina u hrani i piću, a imaju i sposobnost vezanja mikotoksina smanjujući time njihov štetan utjecaj. Fermentacijom pomoću bakterija mliječne kiseline dolazi do smanjenja antinutritivnih sastojaka kao što su fitinska kiselina, tanini i pojedini polifenoli. Njihovim smanjenjem povećava se biodostupnost minerala i aminokiselina, kao i probavljivost proteina i ugljikohidrata.^{46,47} Tijekom fermentacije potpuno ili djelomično dolazi do razgradnje fermentabilnih oligosaharida, disaharida, monosaharida i poliola, takozvanih FODMAP-s, koji uzrokuju sindrom iritabilnog crijeva.⁴⁷ Iako bakterije mliječne kiseline upotrebljavaju pojedine vitamine za svoj rast imaju sposobnost sinteze vitamina B-skupine i vitamina C.⁴⁶ Fermentacijom se postiže i oslobađanje vezanih fenolnih spojeva čime se povećava njihova antioksidativna aktivnost.^{46,47} Bakterije mliječne kiseline imaju sposobnost stvaranja egzopolisaharida. Egzopolisaharidi su makromolekularne tvari koje nastaju polimerizacijom više monosaharida ili njihovih derivata te imaju svojstva prebiotika i pripisuju im se različite biološke aktivnosti poput imunomodulatorne aktivnosti, antitumorskog ili antikancerogenog djelovanja, antioksidativnog djelovanja i aktivnost zaštitnog biofilma.^{25,48} Bakterije mliječne kiseline osim navedenih indirektnih učinaka putem fermentacije imaju i direktne blagotvorne učinke na ljudski organizam kao probiotici. Probiotici se definiraju kao „živi mikroorganizmi koji pridonose zdravlju domaćina kada se primjene u odgovarajućim količinama“.²⁵

Prema *Lebeer i sur.*⁴⁹ mehanizmi djelovanja probiotika preko kojih utječu na zdravlje domaćina su sljedeći:

a) Modulacija sastava i aktivnosti autohtone mikrobiote

Specifični mehanizmi djelovanja unutar mikrobiote (mikrobiotu čovjeka čine svi mikroorganizmi koji žive u simbiozi s ljudskim tijelom)⁵⁰ uključuju inhibiciju patogena putem antimikrobne aktivnosti koja se postiže stvaranjem mliječne kiseline, bakteriocina

i kratkolančanih masnih kiselina, zatim natjecanje za hranjive tvari i promjenu crijevnog metaboloma (kvalitativna i kvantitativna zbirka svih molekula niske molekularne težine-metabolita prisutnih u stanici, koje sudjeluju u općim metaboličkim reakcijama i koje su potrebne za održavanje, rast i normalnu funkciju stanice)⁵¹. Mikrobiota također utječe na probavni kapacitet te konzistenciju i učestalost stolice.

b) Poboljšanje funkcije epitelne barijere crijevne sluznice (intestinalne mukozne barijere)

Ovi mehanizmi uključuju smanjenje propusnosti promicanjem funkcionalnosti međustaničnih veza epitelnih stanica i poboljšanje stanične proliferacije odnosno inhibiranje apoptoze (propadanja) epitelnih stanica.

c) Modulacija imunološkog sustava

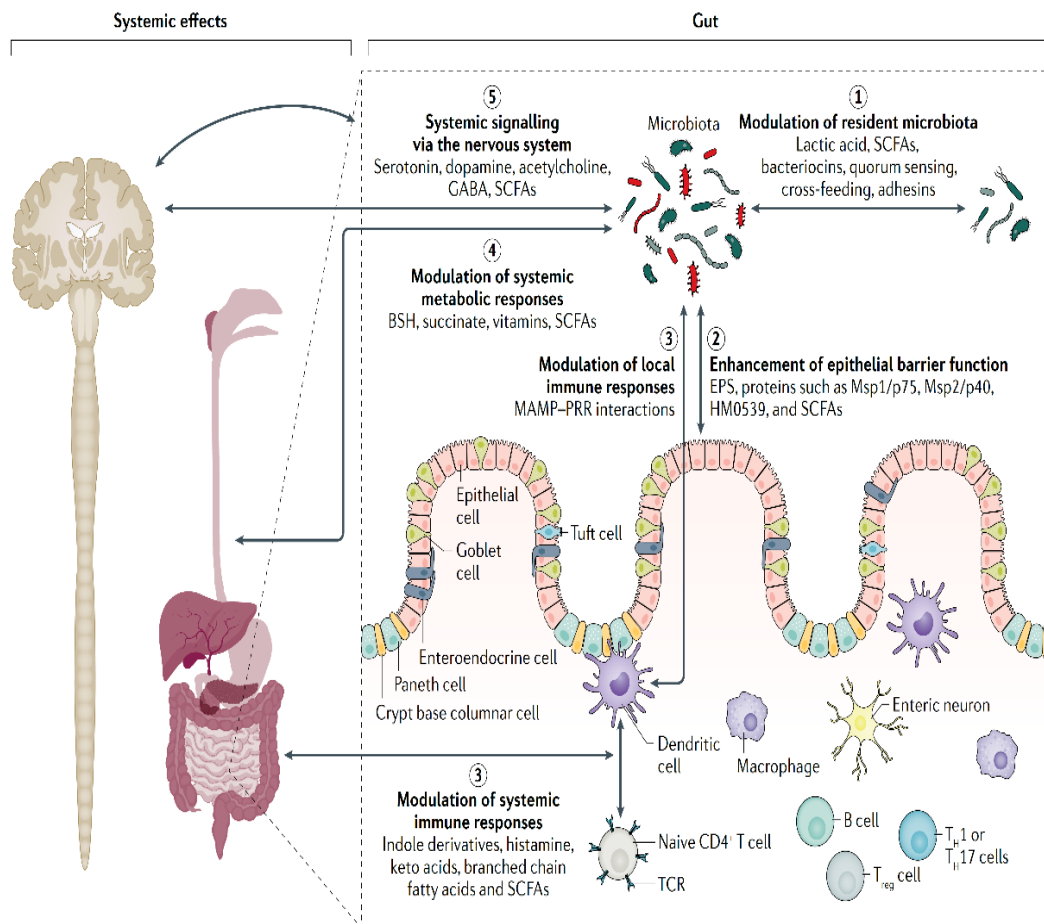
Svi probiotici stupaju u interakciju s receptorima za prepoznavanje uzoraka imunološkog sustava kao što su TL receptori (engl. *Toll-like receptor*) koji imaju važnu ulogu u urođenom imunološkom sustavu, uglavnom kroz interakcije s monocitima, makrofagima i dendritnim stanicama koje dodatno moduliraju ravnotežu pomagačkih i regulacijskih T-stanica (T-limfocita) ili proizvodnju antitijela od strane B-stanica (B-limfocita). Međutim, točan imunološki ishod svakog primjenjenog soja probiotika je drugačiji zbog interakcija koje su specifične za svaki pojedini soj.

d) Modulacija metaboličkih odgovora

Uz izravne metaboličke odgovore u crijevima, probiotici mogu potaknuti i sustavne metaboličke odgovore aktiviranjem ili supresijom enzima. Primjerice aktiviranjem enzima hidrolaze žučne soli mogu djelovati na hormone sitosti i endokrine modulacije čime mogu imati utjecaj na inzulinsku rezistenciju i metabolizam kolesterola. Mogu imati i utjecaj na supresiju aktivnosti enzima koji sudjeluju u procesu nastajanja karcinoma kao što su azoreduktaza, nitroreduktaza, β -glukuronidaza i steroid-7 α -dehidroksilaza.

e) Signalizacija putem centralnog živčanog sustava

Uključuje izravne i neizravne mehanizme probiotičke signalizacije sa središnjim živčanim sustavom putem proizvodnje produkata nastalih od triptofana, γ -aminomaslačne kiseline, kratkolančanih masnih kiselina i oksitocina. Također uočen je utjecaj probiotika na antinocicepciju (djelovanje ili proces blokiranja detekcije bolnog ili štetnog podražaja od strane osjetilnih neurona)⁵² i pokretljivost crijeva.



Slika 4. Grafički sažetak pet glavnih mehanizama djelovanja probiotika⁵³

Tablica 2. Potencijalne i utvrđene zdravstvene koristi povezane s upotrebom probiotika⁵⁴

Zdravstvena korist	Predloženi mehanizam
Prevenција raka	Inhibicija transformacije prokancerogenih tvari u aktivne kancerogene tvari, vezanje/inaktivacija mutagenih spojeva, proizvodnja antimutagenih spojeva, smanjenje rasta prokancerogenih bakterija, smanjenje apsorpcije karcinogena, jačanje imunološke funkcije, utjecaj na koncentracije žučnih soli
Kontrola sindroma iritabilnog crijeva	Modulacija crijevne mikrobiote, smanjenje stvaranja plinova u crijevima
Prevenција atopijskih (alergijskih) bolesti	Modulacija imunološkog odgovora
Utjecaj na upalne bolesti crijeva (Crohnova bolest, ulcerozni kolitis, pouchitis)	Modulacija imunološkog odgovora, modulacija crijevne mikrobiote
Prevenција srčanih bolesti/utjecaj na razinu kolesterola u krvi	Asimilacija kolesterola bakterijskim stanicama, dekonjugacija žučnih kiselina bakterijskim hidrolazama, vezanje kolesterola na bakterijske stanične stijenke, smanjene sinteze kolesterola u jetri i/ili redistribucija kolesterola iz plazme u jetru utjecajem bakterijske proizvodnje kratkolančanih masnih kiselina
Prevenција poremećaja urogenitalnog trakta	Proizvodnja antimikrobnih tvari, natjecanje za mjesta prijanjanja, kompetitivno isključivanje patogena
Prevenција/ublažavanje dijareje uzrokovane bakterijama/virusima	Modulacija crijevne mikrobiote, proizvodnja antimikrobnih tvari, natjecanje za mjesta prijanjanja, stimulacija izlučivanja sluzi, modulacija imunološkog odgovora
Prevenција/liječenje infekcija uzrokovanih <i>Helicobacter pylori</i>	Stvaranje antimikrobnih tvari, stimulacija izlučivanja sluzi, natjecanje za mjesta prijanjanja, stimulacija specifičnih i nespecifičnih imunoloških odgovora
Ublažavanje probavnih smetnji uzrokovanih laktozom	Djelovanje bakterijske β -galaktozidaze
Skraćivanje vremena prolaza kroz debelo crijevo	Utjecaj na peristaltiku kroz proizvodnju bakterijskih metabolita

2 EKSPERIMENTALNI DIO

2.1 Materijali i metode

U eksperimentalnom dijelu rada proizveden je funkcionalni napitak na bazi sladovine. Proizvodnja uključuje tehnologiju obrade slada kojom se dobiva sladovina te fermentaciju sladovine pomoću bakterija mliječne kiseline. Tijekom postupka proizvodnje pratili su se parametri poput pH vrijednosti, specifične gustoće i sadržaja šećera (suhe tvari) sladovine. Za proizvodnju sladovine korištene su 3 vrste ječmenog slada: 900 g slada Finest Lager (proizvođač: Simpsons Malt LTD, Tweed Valley Maltings, UK), 900 g slada Dextrin (proizvođač: Simpsons Malt LTD, Tweed Valley Maltings, UK) i 2000 g slada Pale Ale (proizvođač: Weyermann® Specialty Malting, Njemačka). Fermentacija sladovine provedena je pomoću liofiliziranih starter kultura bakterija mliječne kiseline: *Streptococcus Thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis* i *Bifidobacterium longum* (proizvođač: Lactina ltd, Bugarska).

2.1.1 Uređaji

- ručni mlin za slad; Brewferm, Belgija
- Grainfather G30 (kotao); Grainfather, Novi Zeland
- spiralno vodeno hladilo (dio uređaja Grainfather G30); Grainfather, Novi Zeland
- Grainfather GF30 (fermentor) i GC4 (glikolni rashladni uređaj); Grainfather, Novi Zeland
- pH metar HI 2211; Hanna Instruments, SAD
- hidrometar; Brewferm, Belgija
- refraktometar; Brouwland, Belgija
- GC-MS uređaj; Agilent Technologies, Palo Alto, Santa Clara, CA, SAD

2.1.2 Grainfather sustav

Grainfather sustav je set uređaja namijenjen primarno za proizvodnju piva. Međutim, u ovom radu sustav je iskorišten u svrhu proizvodnje funkcionalnog napitka na

bazi ječmenog slada i to G serija uređaja koju čine Grainfather G30 (kotao), Grainfather GF30 (fermentor) i Grainfather GC4 (glikolni rashladni uređaj).

1. Grainfather G30 je kotao od nehrđajućeg čelika volumena 30 L.⁵⁵ Najvažniji dijelovi uređaja su: plašt kotla, unutarnja košara s perforiranim pločama, poklopac, pumpa, cijev za recirkulaciju i kontrolno kućište. Unutar plašta kotla umeće se košara na čijem dnu se nalazi perforirana ploča koja sprječava ulazak slada unutar pumpe te omogućuje lakše odvajanje sladovine od komine nakon ukomljavanja. Pomoću kontrolnog kućišta kontrolira se temperatura unutar kotla, a pomoću pumpe i cijevi za recirkulaciju sladovina se tijekom samog postupka pretače s donjeg dijela kotla na gornji čime se postiže kontinuirana cirkulacija sladovine kroz sloj slada čime se poboljšava ekstrakcija topljivih tvari. Dio Grainfather G30 uređaja je i spiralno vodeno hladilo koje po završetku procesa ukomljavanja omogućuje brzo hlađenje sladovine na željenu temperaturu fermentacije.



Slika 5. Dijelovi Grainfather G30 uređaja⁵⁶

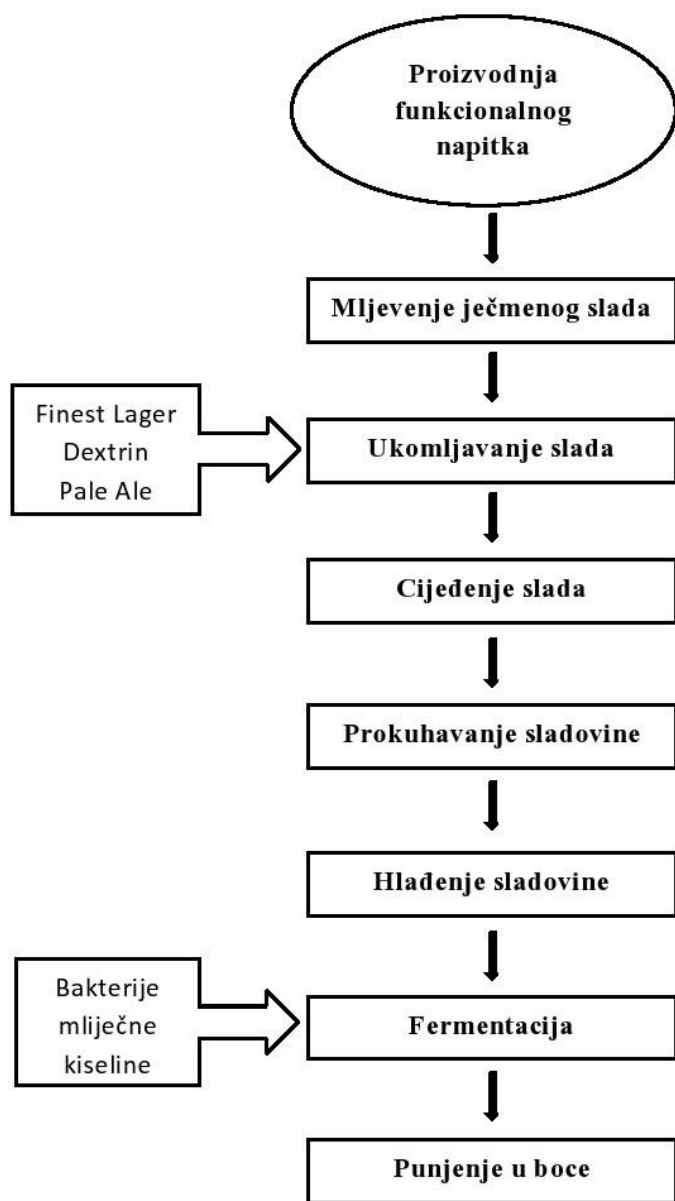
2. Grainfather GF30 je konusni fermentor volumena 30 L.⁵⁵ Izrađen je od nehrđajućeg čelika te sadrži dvostruku stijenku unutar koje su integrirani grijaći element od 30 W i plašt za hlađenje kroz koji struji rashladno sredstvo.⁵⁵ Stijenka fermentora sadrži i 10 mm izolacije od poliuretanske pjene.⁵⁵ Takvom izvedbom omogućena je kontrola i održavanje stalne temperature tijekom trajanja fermentacije. Fermentor uključuje i digitalni regulator temperature, poklopac s otvorom za vrenjaču te slavinu s dva ventila od kojih jedan služi za ispuštanje taloga, a drugi za uzorkovanje i pretakanje.

Grainfather GC4 je rashladni uređaj koji kao rashladno sredstvo koristi propilen glikol.⁵⁵ Izoliranim cijevima se povezuje na fermentor kroz čiji plašt struji rashladno sredstvo čime se omogućuje hlađenje sadržaja unutar fermentora.



Slika 6. Grainfather GF30 (fermentor) i GC4 (glikolni rashladni uređaj)⁵⁷

2.1.3 Tehnologija proizvodnje



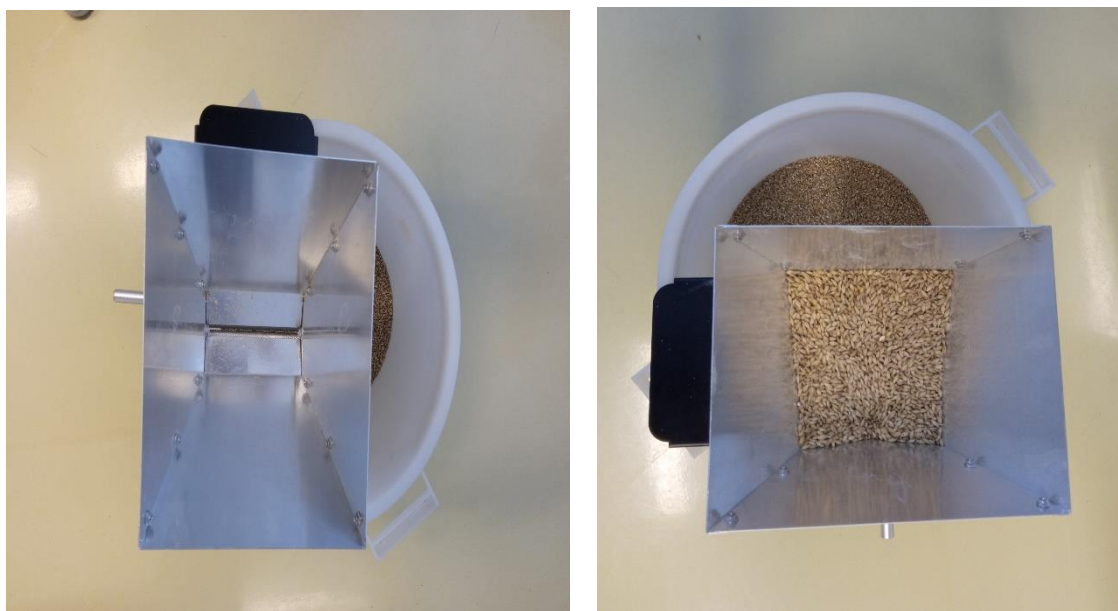
Slika 7. Tehnološka shema proizvodnje funkcionalnog napitka

Mljevenje ječmenog slada

Prvi korak u proizvodnji je mljevenje ječmenog slada. Provedeno je suho mljevenje uz pomoć ručnog mlina s jednim parom valjaka. Razmak između valjaka podešen je ovisno o veličini zrna posebno za svaku vrstu slada kako je prikazano u tablici 3.

Tablica 3. Razmak između valjaka mlina za pojedinu vrstu slada

Vrsta slada	Širina valjaka (mm)
Finest Lager	1,65
Dextrin	1,40
Pale Ale	1,91



Slika 8. Postupak mljevenja slada

Ukomljavanje slada

Proces ukomljavanja proveden je pomoću uređaja Grainfather G30. Unutar kotla dodano je 15 L vode koja je podešavanjem temperature na kontrolnom kućištu zagrijavana na 66 °C. Nakon što je postignuta zadana temperatura vode u unutarnju košaru na čijem dnu se nalazi perforirana ploča dodana je ukupna masa mljevenog slada od 3,8 kg čime je omjer slada i vode približno iznosio 1:4. Ukomljavanje je provedeno izotermno uz povremeno miješanje pri već spomenutoj temperaturi u trajanju od 60 min.

Po završetku ukomljavanja temperatura komine podignuta je na 78 °C i zadržana 10 min kako bi se deaktivirali enzimi te smanjila viskoznost same sladovine čime se olakšava proces odvajanja sladovine od tropa. Nakon toga u unutarnju košaru postavljena je gornja perforirana ploča te uključena pumpa za recirkulaciju u trajanju od 20 min. Cirkulacija sladovine kroz sloj slada omogućava bolju ekstrakciju šećera iz slada kao i filtraciju same sladovine.



Slika 9. Postupak ukomljavanja slada

Odvajanje sladovine od tropa

Sladovina se odvojila od tropa tako što se unutarnja košara izvukla iz kotla i postavila na nosače. Uslijed djelovanja gravitacije sladovina se ocijedila u kotao kroz filterski sloj slada kojeg zadržava donja perforirana ploča unutarnje košare. Odvajanje je provedeno bez ispiranja dodatnom količinom vode.

Prokuhavanje sladovine

Nakon što je postupak odvajanja dovršen temperatura u kotlu podešena je na 100 °C u trajanju od 10 min. Svrha prokuhavanja sladovine je uništenje prisutnih nepoželjnih mikroorganizama koji bi imali negativan utjecaj na tijek fermentacije kao i sigurnost proizvoda.

Hlađenje sladovine

Po završetku prokuhavanja sladovine pristupilo se postupku hlađenja. Hlađenje je provedeno pomoću spiralnog vodenog hladila koje je dio sustava Grainfather, a važno je kako bi se slakovina što prije ohladila na temperaturu fermentacije. Spiralno vodeno hladilo ujedno služi i za pretakanje sladovine iz kotla direktno u fermentor.



Slika 10. Postupak hlađenja sladovine pomoću spiralnog vodenog hladila

Fermentacija

U fermentor je iz kotla pretočeno 5 L ohlađene sladovine, a potom je pomoću kontrolnog kućišta podešena temperatura od 37 °C koja je prema proizvođaču starter kultura bakterija mliječne kiseline optimalna za njihov rast i razvoj. U fermentor je potom dodano i 5 g liofiliziranih kultura bakterija mliječne kiseline koje sadrže rodove *Streptococcus Thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis* i *Bifidobacterium longum*. Sadržaj unutar fermentora je promiješan te je na vrh postavljen poklopac i vrenjača kako bi se osigurali anaerobni uvjeti tijekom fermentacije. Fermentacija se smatra završenom kada na dva uzastopna mjerenja ne dolazi do promjene relativne gustoće, odnosno sadržaja šećera i pH vrijednosti uzorka.



Slika 11. Korišten sustav Grainfather GF30 i GC4 za fermentaciju sladovine

Punjenje u boce

Nakon završetka fermentacije sadržaj iz fermentora je napunjen u staklene boce volumena 330 mL te je funkcionalni napitak pohranjen u hladnjak na +4 °C.



Slika 12. Funkcionalni napitak u boci

Dorada napitka

Provedbom senzorske analize utvrđen je nedostatak slatkoće, a naglašen osjet kiselosti proizvedenog napitka. U svrhu uravnoteženja okusa provedena je dorada odnosno došećeravanje napitka pomoću glicerola i fruktoze. Za provedbu organoleptičkog testiranja u volumen od 200 mL napitka dodano je po 1, 7, 14 i 28 g glicerola, te je isto učinjeno i s jednakim količinama fruktoze.

Prije početka fermentacije određena je pH vrijednost kao i sadržaj šećera/suhe tvari napitka. Karakteristika metabolizma bakterija mliječne kiseline je razgradnja šećera te stvaranje mliječne kiseline. Uslijed navedenog djelovanja dolazi do snižavanja sadržaja šećera kao i pH vrijednosti. Stoga, kako bi pratili tijek fermentacije, njeno pravilno odvijanje i odredili njen kraj, iz fermentora su uzimani uzorci napitka svako drugi dan te su mjerene navedene značajke. Sadržaj šećera je određen pomoću refraktometra i hidrometra, a pH vrijednost pomoću digitalnog pH-metra.

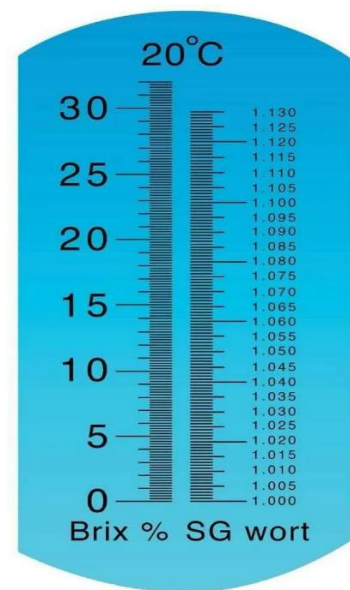
Nakon provedene fermentacije uzet je uzorak napitka te je određen broj bakterija mliječne kiseline. Kako bi se napitak smatrao probiotičkim, čime se povećava njegova funkcionalna vrijednost, mora sadržavati određen broj bakterijskih kolonija (engl. *colony forming units*, CFU) koji je najčešće 10^6 - 10^7 CFU/mL.⁵⁸

2.1.4 Određivanje sadržaja šećera/suhe tvari

Refraktometar je optički mjerni instrument čiji se princip rada temelji na fizikalnom zakonu loma (refrakcije) svjetlosti pri prolasku kroz tvari različite gustoće.⁵⁹ Na osnovu kuta loma dobije se indeks loma pomoću kojeg se određuje relativna gustoća kao i koncentracija otopljenih tvari u uzorku.⁵⁹ Kako bi odredili sadržaj šećera pomoću refraktometra, na suhu i čistu staklenu prizmu doda se nekoliko kapi uzorka, spusti se poklopac te se kroz okular promatra skala koja je u ovom slučaju dvostruka odnosno sadrži vrijednosti izražene u postotku Brix-a (0-32 %) i vrijednosti relativne gustoće (1,000-1,130). Postotak Brix-a (ili stupanj Brix-a) predstavlja mjeru otopljenih krutih tvari u tekućini koja se dobije preko njene relativne gustoće te se posebno koristi za mjerenje otopljenog šećera. 1 % Brix-a jednak je 1 g saharoze u 100 g otopine.⁵⁹ Ako otopina sadrži druge otopljene tvari osim saharoze tada postotak Brix-a približno odgovara sadržaju ukupno otopljenih tvari.



Slika 13. Određivanje sadržaja šećera refraktometrom

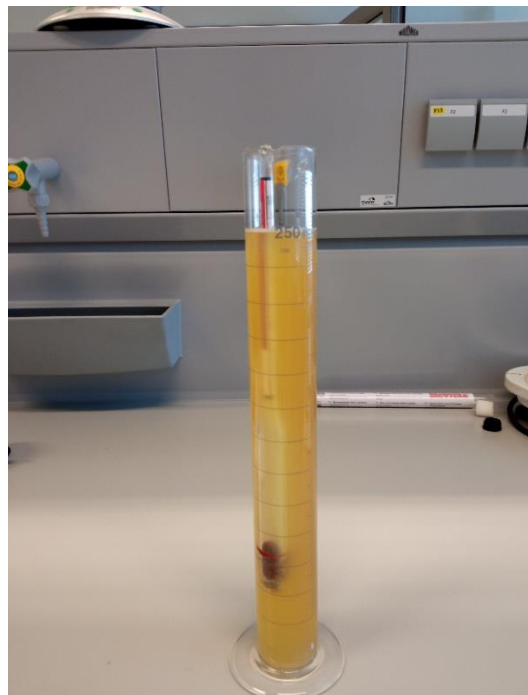


Slika 14. Dvostruka skala refraktometra⁶⁰

Hidrometar je mjerni instrument koji se koristi za određivanje relativne gustoće tekućine na osnovu koje se dobije sadržaj šećera. Njegov rad temelji se na Arhimedovu zakonu prema kojem težina tijela koje pluta na površini tekućine odgovara težini tekućine koja je istisnuta onim dijelom tijela koji se nalazi ispod površine tekućine.⁶¹ Na osnovu toga, u svrhu izjednačavanja vlastite težine s težinom istisnute tekućine hidrometar dublje tone u tekućinama manje gustoće (potrebno je istisnuti veći volumen tekućine kako bi se težine izjednačile), dok će u tekućinama veće gustoće tonuti slabije (potrebno je istisnuti manji volumen tekućine). Relativna gustoća je mjera gustoće tvari u usporedbi s gustoćom vode koja iznosi 1 g/cm^3 ili 1000 kg/m^3 te na skali za relativnu gustoću ima vrijednost 1,000. Ako su u vodi otopljene tvari (npr. šećer) relativna gustoća otopine će biti veća što će rezultirati manjim potonućem hidrometra u otopini nego što bi to bilo u vodi, a čime će se povećavati vrijednosti na skali relativne gustoće (1,000-1,120). Za određivanje relativne gustoće otopine potrebna je menzura od 250 mL u koju se ulije uzorak, zatim se pažljivo uroni hidrometar i očita vrijednost na skali.



Slika 15. Hidrometar⁶²



Slika 16. Određivanje sadržaja šećera hidrometrom

2.1.5 Određivanje pH vrijednosti

Vrijednost pH određuje se korištenjem digitalnog pH-metra. pH-metar je analitički instrument koji mjeri aktivnost vodikovih iona u otopini koja se zatim izražava kao pH vrijednost.⁶³ Sastoji se od voltmetra spojenog na elektrodu koja reagira na pH (staklena elektroda) i referentnu elektrodu (Ag/AgCl ili Hg/HgCl elektroda). Staklena elektroda uronjena u uzorak razvija električni potencijal koji je izravno povezan s aktivnošću vodikovih iona u otopini.



Slika 17. Određivanje pH vrijednosti pomoću digitalnog pH-metra

2.1.6 Određivanje hlapljivih spojeva arome

U svrhu određivanja spojeva arome napitka najprije je provedena sorpcijska tehnika izolacije hlapljivih spojeva koja se naziva mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. *solid-phase microextraction*, SPME). To je brza i učinkovita metoda koja se temelji na upotrebi silikonskog vlakna koje je presvučeno polimernim filmom na kojem se sakupljaju isparljivi spojevi.⁶⁴ SPME nosač sadrži čeličnu iglu unutar koje se nalaze vlakna duljine 1-2 cm presvučena polimerima.⁶⁴ Čeličnom iglom se dolazi do prostora iznad uzorka, koji se nalazi u zatvorenoj posudici, u koji se zatim pritiskom na držač nosača izvlači vlakno. Nakon određenog vremena vlakno se ponovno uvlači u iglu, a igla se vadi iz posude.

Identifikacija spojeva arome provedena je upotrebom sustava plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS). Konfiguracija GC-MS sustava sastavljena je od tri glavna dijela: jedinice za ubrizgavanje (injektiranje) uzorka, kolone koja se koristi za odvajanje spojeva i detektora (otkriva spojeve i prikazuje njihove koncentracije kao električne signale).⁶⁵ Mjesto za injektiranje uzorka i detektor griju se na određenu temperaturu koja je nešto viša od najviše temperature na koloni kako bi se osiguralo brzo uplinjavanje uzorka te spriječila kondenzacija. Analiza započinje uvođenjem igle u injektor plinskog kromatografa gdje se vlakno ispušta te se ekstrahirani spojevi desorbiraju. Potom uzorak nošen strujom mobilne faze (plin-nosač) putuje do stacionarne faze u koloni gdje dolazi do njihove međusobne interakcije. Plin-nosač, odnosno mobilna faza je inertni plin i to najčešće helij (He), a stacionarna faza je ne isparljiva tekućina nanjena na kruti nosač. Protokom inertnog plina koji se koristi kao mobilna faza uzorak prelazi kolonu, a njegovi se dijelovi razdvajaju zbog razlika u kemijskim svojstvima spojeva i njihovim afinitetima prema stacionarnoj fazi. Kolona zadržava molekule na temelju točke vrenja i polarosti, a zatim ih u različito vrijeme otpušta (eluiru) iz kolone, što se naziva vrijeme zadržavanja (engl. *retention time*, RT). Postupkom eluiranja sastojci smjese se mogu potpuno odvojiti čime se omogućuje njihovo kvalitativno i kvantitativno određivanje. Kada spojevi napuste GC kolonu, putuju prema masenom spektrometru (MS) koji ih ionizira i fragmentira pomoću elektronskog izvora ionizacije. Formirani ioni odvajaju se u kvadrupolu (analizatoru), koji se sastoji od četiri dijagonalno povezane elektrode od kojih jedan par elektroda ima pozitivan, a drugi par negativan polaritet, prema njihovim omjerima mase i naboja (m/z) te u ovisnosti o primijenjenoj struji i polju. Samo ion određenog omjera mase i naboja

može zadržati stabilnu putanju i proći između elektroda bez da se neutralizira. Stabilni ioni se detektiraju na elektronskom multiplikatoru koji uzrokuje emisiju elektrona zbog udara upadnih iona u katodu. Elektronski signal se zatim prikazuje u kompjuterskom programu, a rezultat je kromatogram ukupnih iona i spektar masa pojedinog spoja. Maseni spektar je za određenu kemijsku tvar svaki put jednak stoga predstavlja „otisak prsta“ pojedine molekule. Usporedbom spektra analiziranog uzorka sa spektrom iz baze podataka spektara identificiraju se spojevi prisutni u uzorku.

Za određivanje hlapljivih spojeva arome funkcionalnog napitka korišten je GC-MS vezani sustav proizvođača Agilent Technologies (Palo Alto, Santa Clara, CA, SAD) koji se sastoji od plinskog kromatografa 8890A, spektrometra masa 5977E MSD i računala. Uzorak je injektiran pomoću automatskog injektora PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Švicarska). Kolona korištena u analizi je kapilarna kolona HP-5MS (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm debljina filma) proizvođača Agilent Technologies (Palo Alto, Santa Clara, CA, SAD), a sadrži stacionarnu fazu koju čine: 5 % difenil – 95 % dimetilpolisiloksan.

Uvjeti rada plinskog kromatografa:

- temperaturni program kolone: 2 min izotermno na 70 °C, zatim porast temperature od 70 °C do 250 °C (3 °C/min),
- vrijeme u kojem izlazi otapalo, tzv. „*solvent delay*“: 3 min,
- temperatura injektora: 250 °C,
- omjer cijepanja: 1:5,
- plin nositelj: helij s protokom 1 mL/min.

Uvjeti rada spektrometra masa:

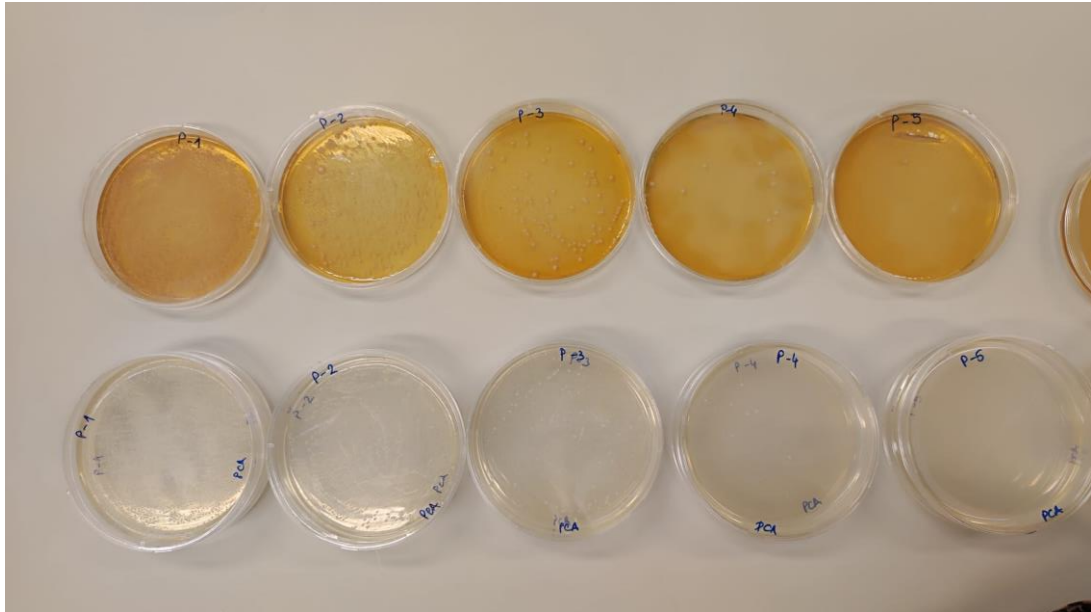
- energija ionizacije: 70 eV,
- temperatura ionskog izvora: 230 °C,
- interval snimanja masa: 30-350 *m/z*.



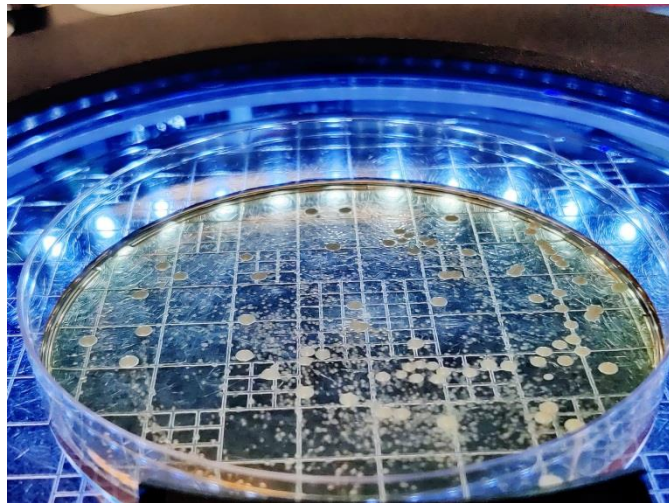
Slika 18. Prikaz korištenog GC-MS sustava

2.1.7 Mikrobiološka analiza

U pripremljenim uzorcima je određen udio bakterija na način da su od uzorka pripremljena decimalna razrjeđenja u rasponu od 10^{-1} do 10^{-5} za određivanje broja bakterija mliječne kiseline, dok je raspon razrjeđenja za ukupne aerobne mezofile bio 10^{-1} do 10^{-6} . Nasijavanje se provodilo metodom razmaza na način da se 100 μL uzorka dodalo na hranjivu podlogu. Za ukupne mezofilne bakterije koristio se Plate Count agar, dok se za bakterije mliječne kiseline koristila MRS podloga (Slika 19). Inkubacija uzoraka je trajala 48 sati pri 30 °C, nakon čega su rezultati očitani brojanjem izraslih kolonija uz pomoć brojača (Slika 20).



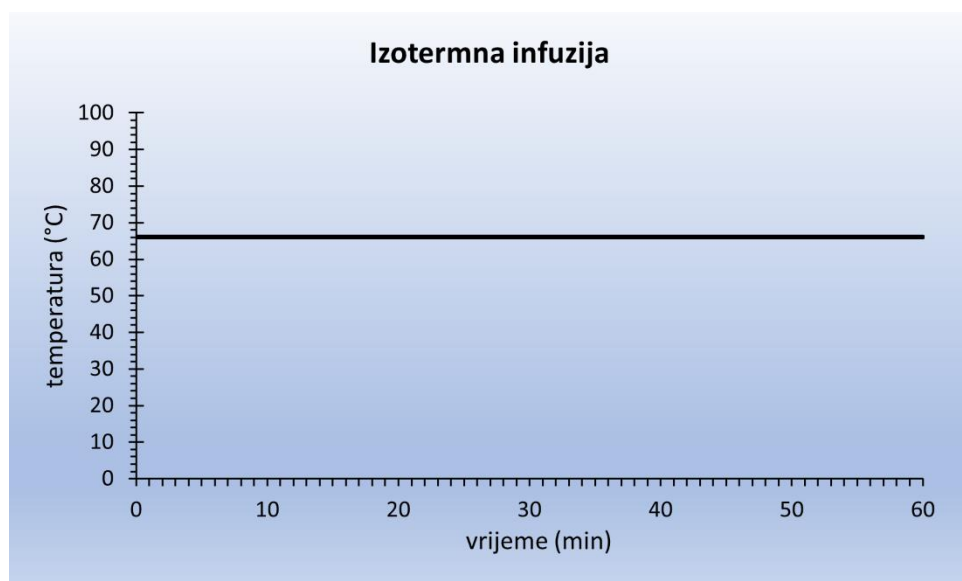
Slika 19. Izgled nasijanih decimalnih razrjeđenja uzorka na korištenim hranjivim podlogama



Slika 20. Brojanje izraslih bakterijskih kolonija korištenjem brojača

3 REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog diplomskog rada bio je proizvesti funkcionalni napitak na bazi sladovine dobivene od ječmenog slada koristeći Grainfather sustav. Tehnologija proizvodnje napitka provedena je u dvije faze, a to su dobivanje sladovine te fermentacija sladovine pomoću bakterija mliječne kiseline. Za dobivanje sladovine korištene su tri vrste slada koje su podvrgnute procesu ukomljavanja u trajanju od 60 min na 66 °C.

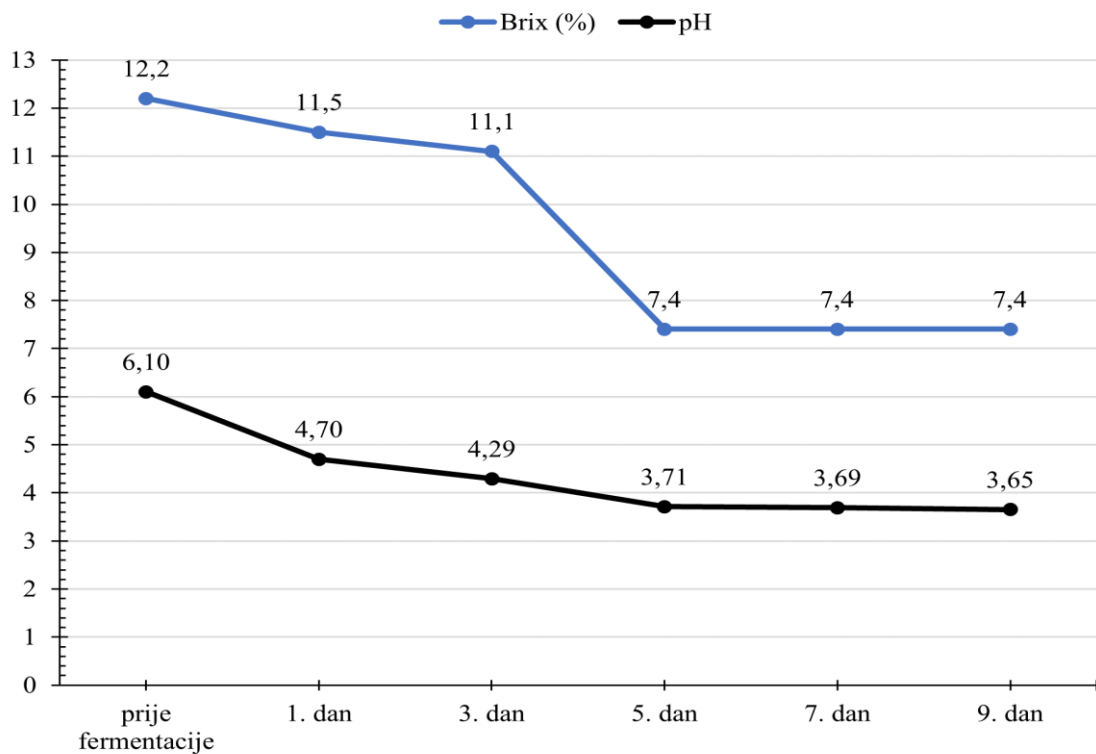


Slika 21. Grafički prikaz izotermne infuzije tijekom postupka ukomljavanja

Po završetku ukomljavanja temperatura je podignuta na 78 °C u svrhu deaktivacije enzima te je provedena recirkulacija sladovine kako bi u otopinu prešli šećeri zaostali u matriksu slada. Nakon toga sladovina je odvojena od tropa cijedenjem bez ispiranja te je prokuhana na 100 °C. Potom je sladovina ohlađena na temperaturu fermentacije pomoću spiralnog vodenog hladila čime se ujedno sladovina prebacila u fermentor. U fermentoru je u 5 L sladovine dodano 5 g liofiliziranih kultura bakterija mliječne kiseline, a temperatura fermentacije podešena je na 37 °C. Tijekom fermentacije uzimani su uzorci napitka svako drugi dan kako bi se pratio udio šećera kao i pH vrijednost te odredio kraj fermentacije što je prikazano u tablici 4 i na slici 22.

Tablica 4. Promjena vrijednosti udjela šećera i pH tijekom fermentacije

	Udio šećera		pH vrijednost
	Brix (%)	SG	
prije početka fermentacije	12,2	1,049	6,10
1. dan	11,5	1,046	4,70
3. dan	11,1	1,045	4,29
5. dan	7,4	1,030	3,71
7. dan	7,4	1,030	3,69
9. dan	7,4	1,030	3,65



Slika 22. Grafički prikaz promjene udjela šećera i pH vrijednosti tijekom fermentacije

Iz tablice kao i iz grafičkog prikaza vidljivo je da je fermentacija trajala 5 dana, obzirom da slijedeća dva dana mjerenja daju iste rezultate udjela šećera te približno iste vrijednosti pH. Nakon 5-og dana bakterije su prestale fermentirati šećere što je dovelo do ustaljenja pH vrijednosti.

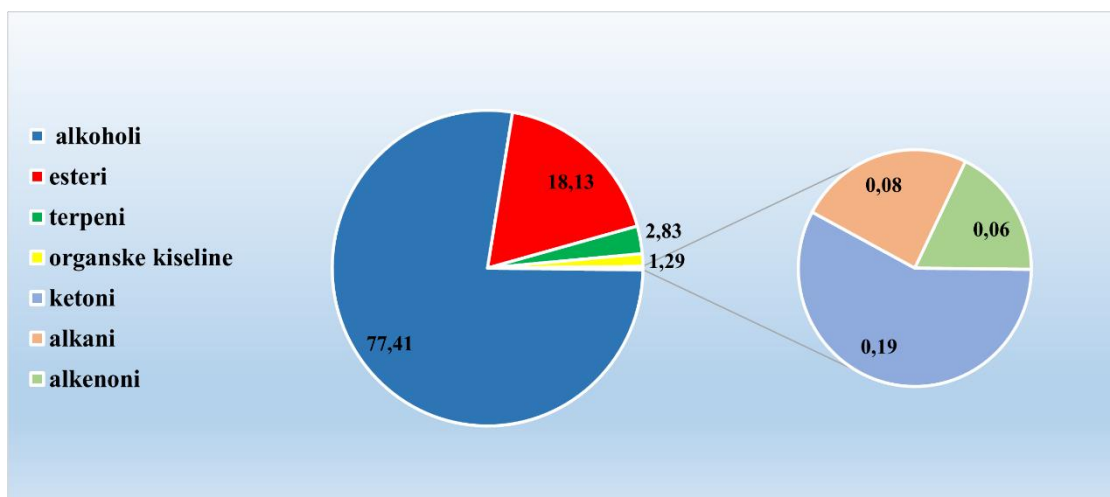
Nakon završetka fermentacije napitak je pretočen u boce od 330 mL i pohranjen u hladnjak na +4 °C. Nekoliko dana nakon skladištenja uzet je uzorak napitka te je određen broj bakterija mliječne kiseline kako bi se utvrdilo da li napitak možemo svrstati i u kategoriju probiotika.

Također provedena je i analiza hlapljivih spojeva arome gotovog funkcionalnog napitka u svrhu identificiranja tvari koje pridonose senzorskim svojstvima samog napitka, a rezultati analize prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Hlapljivi spojevi proizvedenog funkcionalnog napitka

<i>Broj</i>	<i>Ri</i>	<i>Spoj</i>	<i>Udio (%)</i>	<i>Karakteristike mirisa</i>
1	<800	etanol	39,06	po alkoholu, eteričan
2	<800	3-metilbutan-1-ol	27,54	po alkoholu, poput slada
3	876	3-metilbutil acetat	1,59	voćni, po banani
4	983	sabinen	0,61	zemljan, drvenast-biljni, po začinima
5	1003	etil heksanoat	3,11	voćni, po kori jabuke
6	1019	heksil acetat	0,11	zeleno-voćni, poput jabuke, kruške
7	1037	limonen	1,82	citrusni, po limunu
8	1066	γ -terpinen	0,15	tropski, po limeti
9	1075	octan-1-ol	0,82	voštani
10	1101	etil heptanoat	0,06	voćni, po ananasu, banani
11	1103	α -terpinolen	0,12	poput bora
12	1118	2-feniletanol	9,85	slatkast, cvjetni, poput ruže
13	1175	etil benzoat	0,07	voćni, poput višnje i grožđa
14	1181	kaprilna kiselina	1,23	po užglom
15	1193	α -terpinolen	0,09	poput bora
16	1199	etil oktanoat	6,57	voćni, po ananasu
17	1215	oktil acetat	0,12	voćni
18	1249	etil-2-fenilacetat	0,15	cvjetni, po medu
19	1261	2-feniletil acetat	0,55	poput ruže, meda
20	1276	dekan-1-ol	0,11	poput kore naranče

21	1295	undekan-2-on	0,03	voćni
22	1298	etil-nonanoat	0,06	tropski, po rumu
23	1315	4-etenil-2- metoksifenol	0,03	po začinskom bilju, poput klinčića
24	1352	etil-3-fenilpropanoat	0,30	voćni, poput ruže, meda, ruma
25	1365	5-pentiloksolan-2-on	0,16	-
26	1371	kaprinska kiselina	0,07	po užeglom
27	1386	(<i>E</i>)- β -damascon	0,06	voćni, cvjetni
28	1390	etil deka-9-enoat	0,36	voćni
29	1397	etil dekanooat	3,04	voćni, poput jabuke, kruške, grožđa
30	1400	tetradekan	0,05	po vosku
31	1500	pentadekan	0,03	po vosku
32	1510	β -bisabolen	0,04	balzamičan
33	1596	etil dodekanoat	1,90	voštani, po lišću, cvjetni
34	1996	etil heksadekanoat	0,13	voštani, balzamičan



Slika 23. Grafički prikaz udjela pojedine skupine hlapljivih spojeva arome funkcionalnog napitka (%)

Prema GC-MS analizi najveći udio izoliranih i identificiranih hlapljivih spojeva arome funkcionalnog napitka čine alkoholi (77,41 %), od kojih prevladava etanol sa 39,06 %, zatim slijedi 3-metil-butan-1-ol sa 27,54 % te 2-feniletanol sa 9,85 % dok su udjeli ostalih spojeva iz ove skupine ispod 1 %. Drugi po zastupljenosti u ukupnom udjelu

hlapljivih spojeva arome su esteri (18,13 %) od koji valja izdvojiti etil oktanoat sa 6,57 %, zatim etil heksanoat sa 3,11 %, etil dekanat sa 3,04 %, etil dodekanoat sa 1,90 % i 3-metilbutil acetat sa 1,59 %. Esteri, iako drugi po zastupljenosti, čine najraznovrsniju skupinu hlapljivih spojeva arome ovog funkcionalnog napitka. Terpeni čine treću skupinu spojeva s obzirom na zastupljenost (2,83 %) među kojim limonen ima najviši udio (1,82 %), a hlapljive organske kiseline četvrtu skupinu spojeva (1,29 %) od kojih je najzastupljenija kaprilna kiselina (1,23 %). Ostale skupine spojeva (ketoni, alkani i alkenoni) imaju zanemarive udjele u detektiranim ukupnim hlapljivim spojevima.

Senzorskom analizom odnosno organoleptičkim testiranjem (kušanjem) napitka bez dodatka te s dodatkom glicerola i fruktoze panelisti su kao najprihvatljiviji odabrali napitak sa dodatkom 14 g fruktoze na 200 mL. S obzirom na navedeno moguće je promjenom u postupku proizvodnje napitka utjecati na povećanje sadržaja šećera (npr. promjenom trajanja i/ili temperature ukomljavanja) te smanjenje kiselosti (npr. ranijim prekidom fermentacije) kako ne bi bilo potrebno vršiti došećeravanje.

Rezultati mikrobiološke analize su očekivano pokazali visok broj bakterija u uzorku. U oba slučaja, i kod ukupnih aerobnih mezofila i bakterija mliječne kiseline decimalna razrjeđenja 10^{-1} do 10^{-3} su imala rezultat ukupnog broja bakterija >300 . Broj bakterijskih kolonija kod serijskog razrjeđenja 10^{-4} pokazao je vrijednost 268 za ukupne aerobne mezofile, od čega je na bakterije mliječne kiseline otpadalo 218 što ukazuje na dominaciju ovih bakterija u uzorku. Dakle, ukupan broj bakterija u testiranom uzorku iznosio je $2,7 \times 10^6$ CFU/mL od čega su bakterije mliječne kiseline činile $2,2 \times 10^6$ CFU/mL.

4 ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu teorijski je opisan te proizveden funkcionalni napitak na bazi sladovine. Funkcionalnost proizvoda dijelom proizlazi iz same sirovine (ječma) koji sadrži fitokemikalije, a dijelom se postiže i tehnološkim (sladovanje) te biološkim postupkom (fermentacija). U proizvodnji su korištene bakterije mliječne kiseline koje svojim djelovanjem poboljšavaju organoleptička svojstva i produžuju rok trajanja napitka te imaju probiotičko djelovanje. Proizvedeni napitak karakterizira kiselkast okus zbog niske pH vrijednosti (3,65) koja je rezultat nastanka mliječne kiseline tijekom procesa fermentacije. Iako je GC-MS analizom utvrđeno da hlapljive spojeva arome u najvećem udjelu čine alkoholi poput etanola i 3-metilbutan-1-ola do izražaja najviše dolazi citrusni miris (po limunu) koji se pripisuje limonenu, spoju iz skupine terpena. Funkcionalnost napitka postignuta je izborom ječmenog slada kao sirovine te procesom fermentacije pomoću bakterija mliječne kiseline koje na taj način indirektno utječu na funkcionalnost proizvoda stvaranjem različitih poželjnih kao i smanjenjem nepoželjnih spojeva. Mikrobiološkom analizom je potvrđeno da bakterije mliječne kiseline u ovom napitku i direktno utječu na funkcionalnost kao probiotici zbog visokog broja bakterija ($2,2 \times 10^6$ CFU/mL). Funkcionalni napitci su sve popularnija kategorija u području funkcionalne hrane, također sve više ljudi preferira prehranu baziranu na namirnicama biljnog porijekla, stoga ovaj napitak ima i dobar tržišni potencijal.

5 LITERATURA

1. *M. B. Roberfroid*, Defining functional foods, u *G. Gibson* i *C. Williams* (ur.), *Functional Foods*, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, 2000, str. 9-25.
2. *M. Ashwell*, *Concepts of functional foods*, ILSI Europe, Bruxelles, Belgium, 2002.
3. *N. S. Kwak*, *D. J. Jukes*, Functional foods, Part 1: the development of a regulatory concept, *Food Control* 12 (2001) 99-107, doi: 10.1016/S0956-7135(00)00028-1.
4. *C. J. Henry*, Functional foods, *Eur. J. Clin. Nutr.* 64 (2010) 657-659, doi: 10.1038/ejcn.2010.101.
5. *P. M. Verschuren*, Functional Foods: Scientific and Global Perspectives, *Brit. J. Nutr.* 88 (2002) 125-130, doi: 10.1079/BJN2002675.
6. *I. Siró*, *E. Kápolna*, *B. Kápolna*, *A. Lugasi*, Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance – A review, *Appetite* 51 (2008) 456-467, doi: 10.1016/j.appet.2008.05.060.
7. *M. Doyon*, *J. Labrecque*, Functional foods: a conceptual definition, *Brit. Food J.* 110 (2008) 1133-1149, doi: 10.1108/0070700810918036.
8. *D. M. Martirosyan*, *J. Singh*, A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique?, *Funct. Foods Health Dis.* 5 (2015) 209-223, doi: 10.31989/ffhd.v5i6.183.
9. *J. Howlett*, *Functional foods, From Science to Health and Claims*, ILSI Europe, Bruxelles, Belgium, 2008.
10. *A. J. Stein*, *E. R. Cerezo*, *Functional Food in the European Union*, Scientific and Technical Research series, IPTS, Seville, Spain, 2008.
11. *A. T. Diplock*, *P. J. Aggett*, *M. Ashwell*, *F. Bornet*, *E. B. Fern*, *M. B. Roberfroid*, Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document, *Brit. J. Nutr.* 81 (1999) 1-27, doi: 10.1017/s0007114599000471.
12. Guidelines for Use of Nutrition and Health Claims (CAC/GL 23-1997, rev. 1 – 2004), *Codex Alimentarius*.

13. *P. J. Aggett, J. M. Antoine, N. G. Asp, F. Bellisle, L. Contor, J. H. Cummings, J. Howlett, D. J. G. Müller, C. Persin, L. T. J. Pijls, G. Rechkemmer, S. Tuijtelaars, H. Verhagen*, PASSCLAIM-Process for the assessment of scientific support for claims on food, Consensus on Criteria, *Eur. J. Nutr.* 44 (2005) 5-30, doi: 10.1007/s00394-005-1101-6.
14. *L. Kotilainen, R. Rajalahti, C. Ragasa, E. Pehu*, Health Enhancing Foods: Opportunities for Strengthening the Sector in Developing Countries, The World Bank, Washington, USA, 2006.
15. *M. R. Corbo, A. Bevilacqua, L. Petruzzi, F. P. Casanova, M. Sinigaglia*, Functional Beverages: The Emerging Side of Functional Foods, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13 (2014) 1192-1206, doi: 10.1111/1541-4337.12109.
16. *D. E. Briggs*, Malts and Malting, First Edition, Blackie Academic & Professional, London, UK, 1998.
17. *W. Kunze*, Technology Brewing and Malting, 3rd International Edition, VLB Berlin, Berlin, Germany, 2004.
18. *A. H. Cook*, Barley and Malt: Biology Biochemistry, Technology, Academic Press Inc., New York and London, 1962.
19. *M. J. Lewis, T.W. Young*, Brewing, Second Edition, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA, 2002.
20. *L. Axelsson*, Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology, u S. Salminen, A. von Wright i A. Ouwehand (ur.), Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects, Third Edition, Revised and Expanded, Marcel Dekker Inc., New York, USA, 2004.
21. *A. M. Crescenzi*, Factors governing the milling of malt, *J. Inst. Brew.* 93 (1987) 193-201, doi: 10.1002/j.2050-0416.1987.tb04498.x.
22. *A. Laus, F. Endres, M. Hutzler, M. Zarknow, F. Jacob*, Isothermal Mashing of Barley Malt: New Insights into Wort Composition and Enzyme Temperature Ranges, *Food and Bioprocess Technology* 15 (2022) 2294-2312, doi: 10.1007/s11947-022-02885-2.
23. *D. E. Briggs, C. A. Boulton, P. A. Brookes, R. Stevens*, Brewing: science and practice, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, 2017.

24. *M. Mosher, K. Trantham*, *Brewing Science: A Multidisciplinary Approach*, Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland, 2017.
25. *T. T. Angelov, I. Hristova, A. Pavlov, D. Beshkova*, *Lactic Acid Bacteria – From Nature Through Food to Health*, u A. M. Holban i A. M. Grumezescu (ur.), *Advances in Biotechnology for Food Industry, Handbook of Food Bioengineering*, Vol. 14, Elsevier Inc., 2018, str. 91-133.
26. *L. Peyer*, *Lactic acid bacteria fermentation of wort as tool to add functionality in malting, brewing and novel beverages*, PhD Thesis, University College Cork, Ireland, 2017.
27. *T. Bintsis*, *Lactic acid bacteria: their application in foods*, *Int. J. Bacteriol. Mycol.* 6 (2018) 89-94, doi: 10.15406/jbmoa.2018.06.00182.
28. *W. N. Konings*, *The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria*, u R. J. Siezen, J. Kok, T. Abee i G Schasfsma (ur.), *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, Kluwer Academic Publishers, 2002, str. 3-27.
29. *C. Boulton, D. Quain*, *Wort composition*, u C. Boulton i D. Quain (ur.), *Brewing, Yeast and Fermentation*, Blackwell Science Ltd., Oxford, England, 2001, str. 46-60.
30. *S. A. Hayek, S. A. Ibrahim*, *Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review*, *Food Nutr. Sci.* 4 (2013) 73-87, doi: 10.4236/fns.2013.411A010.
31. *B. Mayo, T. A. Piekarczyk, M. Fernández, M. Kowalczyk, P. Á. Martín, J. Bardowski*, *Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria*, u F. Mozzi, R. R. Raya i G. M. Vignolo (ur.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria – Novel Applications*, Blackwell Publishing, Iowa, USA, 2010, str. 3-33.
32. *E. K. Arendt, E. Zannini*, *Cereal grain for the food and beverage industries*, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, 2013, str. 155-191.
33. *E. Idehen, Y. Tang, S. Sang*, *Bioactive phytochemicals in barley*, *J. Food Drug Anal.* 25 (2017) 148-161, doi: 10.1016/j.jfda.2016.08.002.
34. *H. Babade, A. Grupta, S. Sharma*, *Beta-glucan*, u J. Kour i G. A. Nayik (ur.), *Nutraceuticals and Health Care*, Academic Press, Cambridge, UK, 2022, str. 343-358.

35. R. Abdi, I. J. Joye, Prebiotic Potential of Cereal Components, *Foods* 10 (2021) 2338, doi: 10.3390/foods10102338.
36. W. Schlörmann, M. Glei, Potential health benefits of β -glucan from barley and oat, *Ernährungs Umschau* 64 (2017) 145-149, doi: 10.4455/eu.2017.039.
37. A. Din, M. F. J. Chughtai, M. R. K. Khan, A. Shahzad, A. Khaliq, M. A. Nasir, Nutritional and functional perspectives of barley β -glucan, *Int. Food Res. J.* 25 (2018) 1773-1784.
38. kimus, Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslava Krleža, 2021. URL: <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=31468> (1. 5. 2023.)
39. M. B. Roberfroid, Prebiotics and probiotics: are they functional foods?, *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (2000) 1682-1687, doi: 10.1093/ajcn./71.6.1682S.
40. M. P. Arena, G. Caggianiella, D. Fiocco, P. Russo, M. Torelli, G. Spano, V. Capozzi, Barley β -Glucans-Containing Food Enhances Probiotic Performances of Beneficial Bacteria, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 3025-3039, doi: 10.3390/ijms15023025.
41. A. A. M. Andersson, A. M. Lampi, L. Nyström, V. Piironen, L. Li, J. L. Ward, K. Gebruers, C. M. Courtin, J. A. Delcour, D. Boros, A. Fraś, W. Dynkowska, M. Rakszegi, Z. Bedo, P. R. Shewry, P. Aman, Phytochemical and Dietary Fiber Components in Barley Varieties in the HEALTHGRAIN Diversity Screen, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 9767-9776, doi: 10.1021/jf802037f.
42. A. K. Singh, J. Rehal, A. Kaur, G. Jyot, Enhancement of attributes of cereals by germination and fermentation: A review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55 (2015) 1575-1589, doi: 10.1080/10408398.2012.706661.
43. A. Hassani, S. Procopia, T. Becker, Influence of malting and lactic acid bacteria fermentation on functional bioactive components in cereal-based raw materials: A review paper, *Int. J. Food Sci. Tech.* 51 (2016) 14-22, doi: 10.1111/ijfs.12965.
44. F. Hübner, E. K. Arendt, Germination of Cereal Grains as a Way to Improve the Nutritional Value: A Review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53 (2013) 853-861, doi: 10.1080/10408398.2011.562060.

45. *J. K. Sharma, M. Sihmar, A. R. Santal, L. Prager, F. Carbonero, N. P. Singh*, Barley Melanoidins: Key Dietary Compounds with Potential Health Benefits, *Front. Nutr.* (2021), doi: 10.3389/fnut.2021.708194.
46. *D. M. Waters, A. Mauch, A. Coffey, E. K. Arendt, E. Zannini*, Lactic Acid Bacteria as a Cell Factory for the Delivery of Functional Biomolecules and Ingredients in Cereal Based Beverages: A review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55 (2015) 503-520, doi: 10.1080/10408398.2012.660251.
47. *P. Tsafarakidou, A. M. Michaelidou, C. G. Biliaderis*, Fermented Cereal-Based Products: Nutritional Aspects, Possible Impact on Gut Microbiota and Health Implications, *Foods* (2020), doi: 10.3390/foods9060734.
48. *Y. Wang, J. Wu, M. Lv, Z. Shao, M. Hungwe, J. Wang, X. Bai, J. Xie, Y. Wang, W. Geng*, Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry, *Front. Bioeng. Biotechnol.* (2021), doi: 10.3389/fbioe.2021.612285.
49. *S. Leeber, P. A. Bron, M. L. Marco, J. P. Van Pijkeren, M. O'C. Motherway, C. Hill, B. Pot, S. Roos, T. Klaenhammer*, Identification of probiotic effector molecules: present state and future perspectives, *Curr. Opin. Biotechnol.* 49 (2018) 217-223, doi: 10.1016/j.copbio.2017.10.007.
50. *I. Antal, M. Jelić, S. Sila, S. Kolaček, A. T. Andrašević*, Ljudska mikrobiota i mikrobiom, *Acta Med. Croat.* 73 (2019) 3-11.
51. *E. M. Færgestad, Ø. Langsrud, M. Høy, K. Hollung, S. Sæbø, K. H. Liland, A. Kohler, L. Gidskehaug, J. Almergren, E. Anderssen, H. Martens*, Analysis of Megavariate Data in Functional Genomics, u S. Brown, R. Tauler i B. Walczak (ur.), *Comprehensive Chemometrics, Chemical and Biochemical Data Analysis*, Vol. 1, Elsevier Inc., 2009, str. 221-278.
52. „Antinociception“, Merriam-Webster.com Medical Dictionary, Merriam-Webster. URL: <https://www.merriam-webster.com/medical/antinociception> (5. 5. 2023.)
53. „Graphical summary of 5 main mechanisms of action for probiotics, Image by Sarah Lebeer“. URL: <https://isappscience.org/episode-6-mechanisms-of-action-for-probiotics> (5. 5. 2023.)

54. *D. Harzallah, H. Belhadj*, Lactic Acid Bacteria as Probiotics: Characteristics, Selection Criteria and Role in Immunomodulation of Human GI Muccosal Barrier, u M. Konogo (ur.), Lactic Acid Bacteria – R & D for Food, Health and Livestock Purposes, InTech, 2013, str. 197-216.
55. URL: <https://help.grainfather.com/hc/en-us/articles/4423107341329-Product-Guide-to-the-G-S-Series> (29. 7. 2023.)
56. URL: <https://help.grainfather.com/hc/en-us/sections/4404029248785-G-series-> (29. 7. 2023.)
57. URL: <https://www.themaltmiller.co.uk/product/grainfather-conical-fermentor-pro-wifi-controller/?v=fd4c638da5f8> (29. 7. 2023.)
58. *P. Matouskova, J. Hoova, P. Rysavka, I. Marova*, Stress Effect of Food Matrices on Viability of Probiotic Cells during Model Digestion, *Microorganisms* 9 (2021) 1625, doi: 10.3390/microorganisms9081625.
59. *R. Rodrigues*, The Refractometer, How It Works and Role in the Food Industry, *Technology Networks Applied Sciences* (2023).
60. URL: <https://distillique.co.za/blogs/default-blog/incorrect-readings-comparing-refractometer-and-sg-hydrometer-readings> (31. 7. 2023.)
61. URL: <https://www.scribd.com/document/61597175/Hydrometer> (31. 7. 2023.)
62. URL: <https://brouwland.com/en/densimeters/15928-beer-hydrometer-brewferm-with-2-scales.html> (31. 7. 2023.)
63. URL: <https://www.britannica.com/technology/pH-meter> (2. 8. 2023.)
64. *M. A. Mottaleb, M. J. Mezziani, M. R. Islam*, Solid-phase Microextraction and Its Application to Natural Products and Biological Samples, *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (2019), doi:10.1002/9780470027318.a9905.pub2.
65. *M. C. McMaster*, *GC/MS: A Practical User's Guide*, Second Edition, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, SAD, 2008, str. 3-46.